

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO  
LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTRATEGIA PARA LA CLONACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL A  
PARTIR DE BIOESPECÍMENES POSITIVOS  
PARA VPH**

**Presentado por**

**Q.F.B. RICARDO GUTIÉRREZ MENDOZA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL  
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**MAYO, 2010**

# **ESTRATEGIA PARA LA CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL A PARTIR DE BIOESPECÍMENES POSITIVOS PARA VPH.**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Dr. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
**Director de Tesis**

---

**Dra. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA**  
**Co-Directora**

---

**Dra. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ**  
**Co-Directora**

---

**Dr. med. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## ÍNDICE

	<b>PÁGINA</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Incidencia y etiología del cáncer cérvico-uterino	1
1.2 Biología molecular y estructural del VPH	5
1.3 Tratamiento en México	9
1.4 Vacunas disponibles	10
1.5 Taxonomía del VPH	11
1.6 Aislamiento e identificación viral	14
1.7 Antecedentes	16
1.7.1 Epidemiología	16
1.7.2 Variación genética y epigenética	17
1.7.3 Factores de riesgo no-genéticos	17
1.7.4 Biomarcadores	18
1.7.4.1 Biomarcadores de susceptibilidad al VPH	18
1.7.4.2 Biomarcadores de eliminación de la infección por VPH	18
1.8 JUSTIFICACIÓN	20
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
<b>CAPÍTULO III. ESTRATEGIA GENERAL</b>	22
<b>CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
4.1 Material	25
4.1.1 Estuches	25
4.1.2 Reactivos y consumibles	25
4.1.3 Material biológico	26
4.2 Equipo	26
4.2.1 Programas bioinformáticos	27
4.3 Métodos	28
4.3.1 Diseño de iniciadores utilizados en este trabajo	28
4.3.2 Clonación de los productos amplificados	29
4.3.3 Condiciones de reacción y estandarización en PCR larga de ~3Kb	29
4.3.4 Transformación de bacterias electrocompetentes	32
4.3.5 Tamizaje de las clonas candidatas	32
4.3.6 Técnica de lisis alcalina	35

4.3.7 Verificación de la calidad del vector	35
4.3.8 Selección de clonas positivas por restricción	36
4.3.9 Secuencias de referencia utilizadas en este estudio	36
4.3.10 Secuenciación	37
4.3.11 Identificación de las secuencias virales clonadas	38
4.3.12 Ensamblaje de la región viral clonada	38
4.3.13 Análisis de las secuencias nucleotídicas	38
<b>CAPÍTULO V. RESULTADOS</b>	
5.1 Diseño de oligonucleótidos	39
5.2 Amplificación del fragmento sub-genómico de ~5kb de VPH 16 y otros	40
5.3 Optimización de la PCR larga para la amplificación del fragmento sub-genómico de ~5kb	41
5.4 Amplificación del fragmento sub-genómico de ~3Kb de VPH16	42
5.5 Optimización de la PCR larga para la amplificación del fragmento sub-genómico de ~3kb	44
5.6 Clonación de los amplicones en el vector pCR® TOPO® XL	45
5.7 Caracterización enzimática de las clonas positivas	45
5.8 Secuenciación de las clonas caracterizadas	48
5.9 Verificación de la calidad de las secuencias obtenidas	49
5.10 Confirmación de las secuencias virales clonadas	50
5.11 Alineamiento de las secuencias	51
5.12 Biobanco	52
<b>CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN</b>	
6.1 Aspectos técnicos de la metodología desarrollada	53
6.1.1 Diseño de iniciadores	53
6.1.2 Estandarización de la PCR	54
6.1.3 Clonación y selección de clonas	55
6.1.4 Secuenciación	57
6.2 Aspectos científicos de la metodología desarrollada	57
6.3 Perspectivas	59
<b>CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES</b>	
7.1 Diseño de iniciadores	60
7.2 Estandarización de la PCR y clonación	60
7.3 Secuenciación	60
7.4 Biobanco	61
<b>CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA</b>	62

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
Figura 1. Frecuencia de neoplasias malignas estratificadas por sexo y tipo	2
Figura 2. Historia natural de la infección por VPH y cáncer	4
Figura 3. Mapa del genoma de VPH 16 y representación de la estructura de uno de los VPHs más estudiados	6
Figura 4. Cambios en los patrones de expresión a lo largo de la progresión a CaCU	7
Figura 5. Mecanismo de carcinogénesis por VPH	8
Figura 6. Clasificación de los papilomavirus	12
Figura 7. Organización genómica y clonas obtenidas por PCR del candidato VPH 87	15
Figura 8. Estrategia general	21
Figura 9. Fragmentos del alineamiento de las secuencias de cuatro especies de VPH	36
Figura 10. Resultado de la PCR larga para el fragmento de ~5kb	37
Figura 11. Resultado de la PCR larga para el fragmento de ~5kb para LC15	39
Figura 12. Resultado de la PCR larga para el fragmento sub-genómico de ~3kb	40
Figura 13. Resultado de la PCR larga para el fragmento de ~3kb para LC15	41
Figura 14. Tamizaje mediante PCR en colonia de vectores recombinantes portadores del fragmento sub-genómico de interés	43
Figura 15. Caracterización enzimática in silico	44
Figura 16. Patrón electroforético de restricción con las enzimas Eco RI y Hind III	45
Figura 17. Esquema representando el genoma de VPH 16	46
Figura 18. Gráfico que representa la secuencia de uno de los amplicones secuenciados con iniciadores internos	47
Figura 19. Blastn de las secuencias obtenidas	48
Figura 20. Parte representativa del alineamiento de las secuencias armadas de LC15 y LC12	48

## LISTA DE CUADROS

	<b>PÁGINA</b>
Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores utilizados en el estudio	26
Cuadro 2. Condiciones de reacción de PCR larga	27
Cuadro 3. Programa de amplificación de PCR larga utilizando rampa de temperaturas de alineamientos	28
Cuadro 4. Programa de PCR largo convencional con incrementos de tiempo de extensión	29
Cuadro 5. Condiciones de reacción en PCR largo convencional	29
Cuadro 6. Condiciones de reacción para PCR directo de colonia con iniciadores PGMY	30
Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores reportados PGMY	31
Cuadro 8. Números de acceso de secuencias de VPH 16	33
Cuadro 9. Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de secuenciación de las clonas de interés	34
Cuadro 10. Biobanco	

## LISTA DE ABREVIATURAS

csp	Cantidad suficiente para
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
h	Horas
kb	Kilobases
kV	Kilo volts
LIE	Lesión intraepitelial escamosa
LIEAG	Lesión intraepitelial de alto grado
LIEBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
LCR	Región larga de control
mM	Concentración milimolar
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramos
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PA	Producto amplificado
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pmol	Picomol
rpm	Revoluciones por minuto
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Solución amortiguadora de Tris y EDTA
U	Unidades de enzima
VPH	Virus del papiloma humano
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Veces la concentración
μF	Micro Faradio
μg	Microgramo
μL	Microlitros
μM	Concentración micromolar
Ω	Ohms
°C	Grados centígrados

## RESUMEN

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular**

**Q.F.B. Ricardo Gutiérrez Mendoza**

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 73

### **Título del estudio: ESTRATEGIA PARA LA CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL A PARTIR DE BIOESPECÍMENES POSITIVOS PARA VPH.**

El CaCU es la tercera causa de muerte a nivel mundial. El virus del papiloma humano (VPH) juega un papel importante en la génesis del CaCU. Según su potencial oncogénico, los VPHs se clasifican como de alto o bajo riesgo. En años recientes se ha identificado a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, principalmente, como de alto riesgo, por encontrarse fuertemente asociados al CaCU en más del 95% de los casos. Se sabe que otros tipos de VPH, como el 6, 11, 42, 43 y 44, entre otros, muestran una débil asociación con CaCU, denominándose, por tanto, de bajo riesgo. Se ha venido investigando intensamente en busca de diferencias entre ambos tipos de VPHs (bajo versus alto riesgo) y ahora se sabe que dichas diferencias residen en variaciones de los genes del genoma viral que resultan en proteínas responsables de la progresión a cáncer cuando se expresan de manera aberrante. En esta investigación se diseñó, implementó y validó una estrategia para la clonación y caracterización del genoma de los VPHs en bioespecímenes clínicos, como un prerrequisito para caracterizar dichos genes, entre otros objetivos.

Con el alineamiento de los genomas completos de cuatro especies de papilomavirus distantes entre sí, se logró un diseño de iniciadores consenso útiles para la amplificación de la mayoría de los papilomavirus humanos de interés, especialmente de los que se clasifican como de alto riesgo oncogénico. Después de algunos eventos de estandarización se validó el diseño con la amplificación y clonación de fragmentos sub-genómicos de ~3kb y ~5kb, que en conjunto abarcan los 8 kb del genoma viral presente en los bioespecímenes. Se lograron obtener clonas a partir de las amplificaciones e inserciones en vectores de propagación de los dos fragmentos sub-genómicos provenientes de bioespecímenes positivos para VPH 16 del proyecto del laboratorio referido como "Lesiones", caracterizándolas posteriormente por sus patrones de restricción. Para dos de los bioespecímenes marcados con los códigos LC15 y LC12, se demostró la obtención de las secuencias nucleotídicas de los genomas virales casi por completo. Las dos secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en Genbank encontrando algunas diferencias nucleotídicas. Las clonas generadas fueron resguardadas y los datos relevantes se asociaron a las mismas en el Biobanco de la Unidad de Biotecnología Médica (UBM), para su futuro aprovechamiento biomédico y biotecnológico.

---

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
Asesor



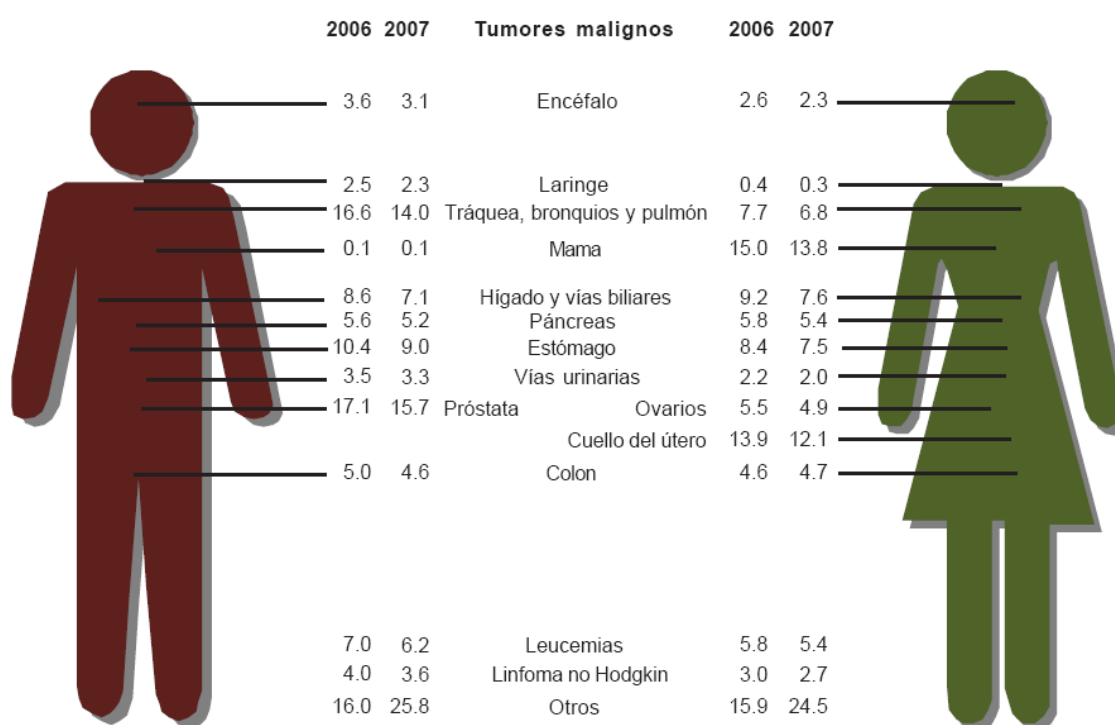
## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Incidencia y etiología del Cáncer Cérvico-Uterino.

El cáncer se define como un conjunto de más de 100 enfermedades, que incluye tumores malignos en diferentes sitios del cuerpo humano. El común denominador de todas las formas de esta enfermedad es el fallo de los mecanismos que regulan la proliferación normal de las células y su muerte. Al final resulta en la progresión del tumor con invasión a tejidos vecinos y eventualmente, la dispersión a otras áreas del cuerpo, incluyendo órganos vitales, lo que consume la vida de las pacientes<sup>1</sup>.

El cáncer cérvico uterino (CaCU) se clasificó como la tercera causa de muerte en mujeres a nivel mundial en 2007<sup>22</sup>. Para el año 2000 hubo en el mundo 471,000 nuevos casos diagnosticados y 288,000 muertes por este padecimiento<sup>2</sup>. Se calcula que el 80% de esas muertes sucedieron en países en vías de desarrollo. Siguiendo la misma tendencia en, 2002 sucedieron más de 273,000 decesos y 493,000 nuevos casos<sup>20</sup>. En 2004 una revisión a las estadísticas de la OMS reveló la lamentable cifra de 309,808 muertes por CaCU y más de 555,000 nuevos casos, mostrando una tendencia ascendente realmente alarmante<sup>22</sup>. Si bien, es cierto que el CaCU es fácilmente prevenible, las mujeres que se encuentran en países en vías de desarrollo no tienen acceso a programas efectivos de detección oportuna y poco se ha avanzado en terapias más efectivas para los casos detectados tardíamente<sup>2</sup>.

En México, las estadísticas vitales proporcionadas por el INEGI en el 2004 muestran que de las 31,443 defunciones de mujeres por neoplasias, el 13.5% correspondieron a CaCUs, siendo la otra neoplasia de gran importancia el cáncer de mama (CaMama), con el 13.3% de las muertes<sup>3</sup>. Para el 2005 a 2007 cambió la tendencia, situando al CaCU como la segunda causa de muerte por tumores malignos en México, terminando en primer lugar el CaMama<sup>21</sup> (véase figura 1). Con estos números es posible calcular que en México aun muere una mujer cada dos horas debido al CaCU.



**Figura 1. Frecuencia de neoplasias malignas estratificadas por sexo y tipo.** Datos tomados de las Estadísticas Vitales del INEGI, según la Base de Datos 2007<sup>21</sup>.

La tendencia en los países desarrollados a desaparecer y la de mantenerse con una alta incidencia entre las mujeres de menores ingresos en éstos y aun más en los países en vías de desarrollo, evidencia su relación con los factores socioeconómicos de la población. México ha concentrado su lucha

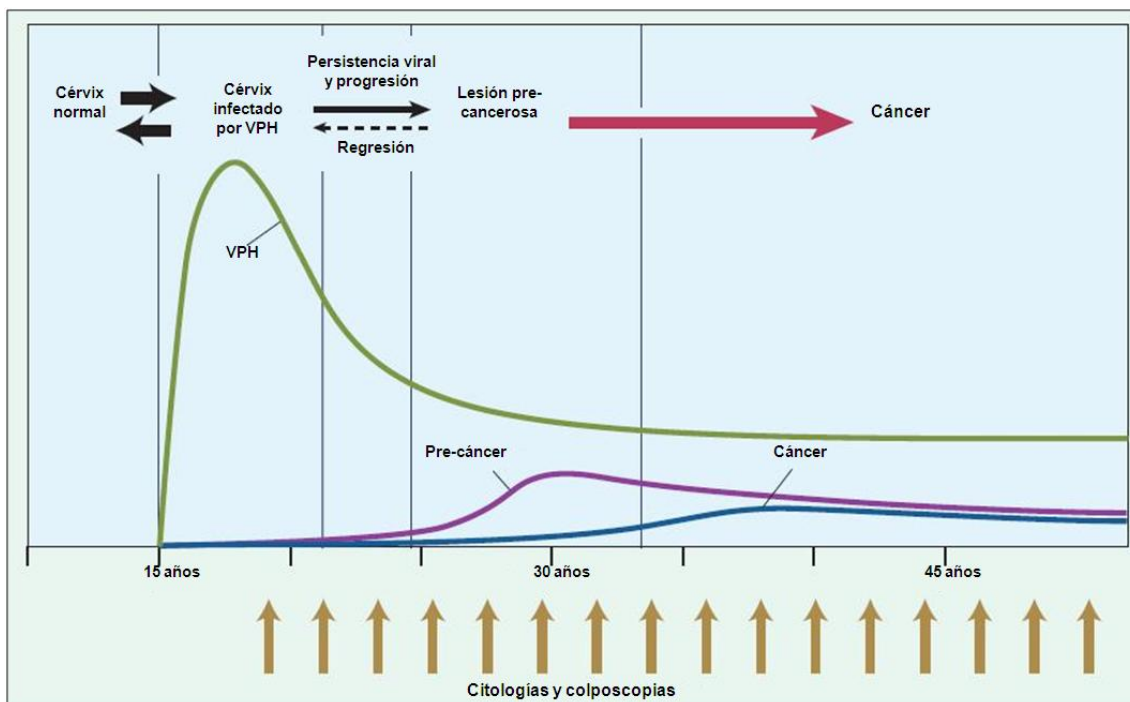
contra el CaCU en la detección oportuna, como la mejor medida para su control y eventual desaparición<sup>21</sup>.

Desde la publicación por Papanicolaou y Traut en 1943 en su monografía de la citología vía vaginal como método de detección para el CaCU, la tinción de papanicolaou, como ha sido nombrada desde entonces, ha llegado a ser la prueba diagnóstica más comúnmente utilizada para la detección de anomalías citológicas en el cérvix y la mejor herramienta de detección de cáncer instituida, logrando reducir dramáticamente la incidencia del CaCU<sup>23</sup>.

En 1976 Harald zur Hausen postuló que el virus del papiloma humano (VPH) jugaba un papel importante en la génesis del CaCU, y la abrumadora evidencia acumulada desde entonces le valió que fuera galardonado con el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2008. A partir de la década de los años ochenta y gracias al esfuerzo de varios investigadores, entre ellos el propio zur Hausen y su colaboradora, la Dra. Nubia Muñoz, se ha establecido la presencia del VPH como la causa necesaria más no suficiente para el desarrollo de este cáncer<sup>4</sup>. En los casos de CaCU invasor, se postula la presencia del VPH con el 99.7% de éstos, cifra que es la más alta que se ha atribuido a algún factor como causa de cáncer<sup>5</sup>. Por lo anterior existe un gran interés por detectar el DNA viral como ensayo preliminar para CaCU.

Se ha observado que la mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente, pero en el caso de infecciones persistentes con VPHs de alto riesgo oncogénico (ver más adelante), es posible que suceda una

progresión a una lesión cervical pre-invasora de alto grado (neoplasia intraepitelial cervical) o CaCU (véase figura 2).



**Figura 2. Historia natural de la infección por VPH y cáncer.** El ápice de prevalencia de infecciones transitorias con tipos carcinogénicos de VPH (línea etiquetada como VPH) sucede en mujeres adolescentes, después del inicio de la actividad sexual. El ápice de prevalencia de condiciones pre-cancerosas ocurre aproximadamente diez años después (línea etiquetada como Pre-cáncer) y el ápice de prevalencia de cánceres invasores entre los cuarenta y cincuenta años de edad (línea etiquetada como Cáncer). El modelo convencional de la prevención del CaCU se basa en repetidas rondas de citología, incluyendo tinciones de papanicolaou y colposcopia (flechas verticales)<sup>23</sup>. (Modificado de Runowicz, *et al*, 2007)

Los VPHs se clasifican como de alto o bajo riesgo oncogénico según su potencial oncogénico. En años recientes se ha identificado a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, principalmente, como de alto riesgo, por encontrarse fuertemente asociados al CaCU en más del 95% de los casos. Por otra parte, se informa que otros tipos de VPHs, como el 6, 11, 42, 43 y 44, entre otros, muestran una débil asociación con CaCU denominándose, por tanto, de bajo riesgo<sup>4</sup>. Tanto los unos como los otros se sabe que infectan

células epiteliales causando desde verrugas comunes en el caso de los virus de bajo riesgo, hasta neoplasias cervicales y cáncer en el de los de alto riesgo<sup>5</sup>.

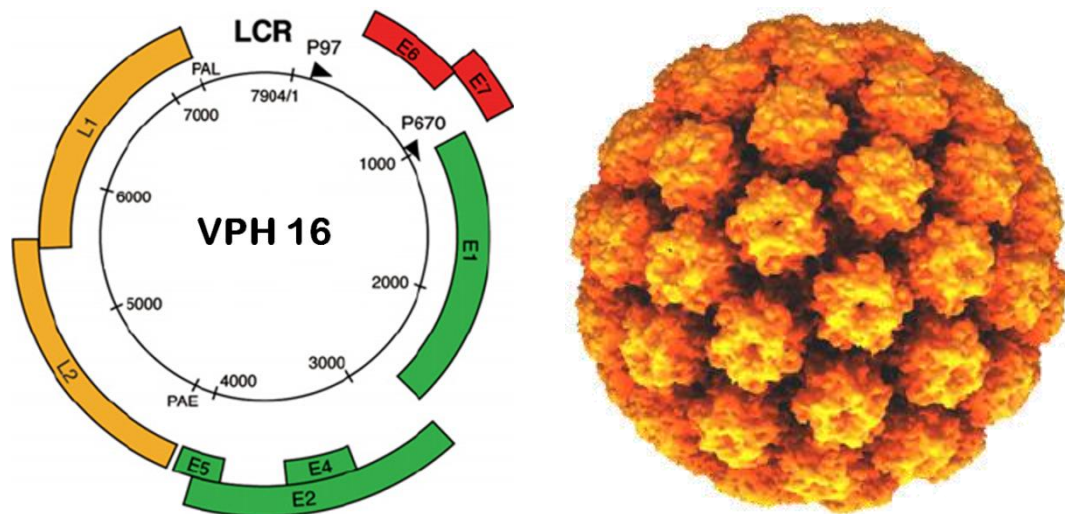
## **1.2 Biología molecular y estructural del VPH.**

Se ha venido investigando intensamente en busca de diferencias entre ambos tipos de VPHs (bajo versus alto riesgo). Ahora se sabe que dichas diferencias residen en variaciones de los genes del genoma viral que resultan en proteínas responsables de la progresión a cáncer, cuando se expresan de manera aberrante.

El genoma de los VPHs está constituido por una doble cadena circular de DNA de aproximadamente 8 Kb, protegida por una cápside icosaédrica que consta de 72 capsómeros, cuyas proteínas constituyentes son codificadas por los genes L1 y L2. Se ha comprobado que a pesar de su pequeña talla, el virus despliega una biología molecular muy compleja. En su genoma se han identificado tres oncogenes que modulan el proceso de transformación: E5, E6 y E7; dos proteínas regulatorias que modulan tanto la replicación como la transcripción: E1 y E2; y otras tantas que son proteínas estructurales y componen la cápside viral<sup>6</sup>: L1 y L2. Además entre los genes L1 y E6 existe una secuencia denominada región larga de control (LCR), que es donde se encuentra la mayoría de los promotores génicos (*véase figura 3*).

Se sabe que la asociación entre el CaCU y el VPH es mayor incluso que la asociación del cigarro con el cáncer de pulmón. Se ha comprobado que mujeres con examen Papanicolaou normal, pero a las que se les ha detectado

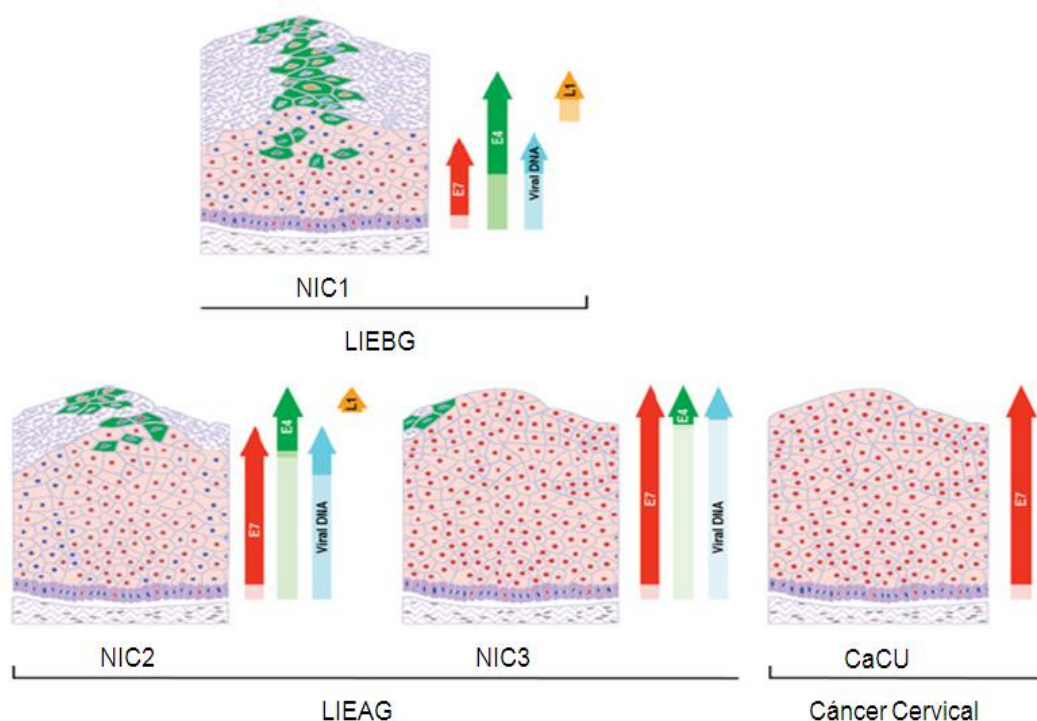
el DNA de algún VPH, se encuentran en riesgo de presentar lesiones intraepiteliales escamosas (LIE). Adicionalmente, cuando una mujer es detectada con una lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) portando el genoma del VPH, aumenta su riesgo de progresar a una lesión de alto grado (LIEAG) o CaCU<sup>11</sup>.



**Figura 3. Mapa del genoma y representación de la estructura de uno de los VPHs más estudiados.** Incluye algunos de los promotores de sus genes y una representación gráfica de la cápside de este tipo viral (modificado de Doorbar, 2006).

Las lesiones de alto grado y el cáncer que sobreviene a partir de este tipo de lesiones, son el resultado de una forma especial de infección abortiva, que ocurre cuando el virus infecta células que no permiten el desarrollo completo del ciclo viral, pero se abre la posibilidad de su integración en el genoma de la mujer infectada. Se ha sugerido que este fenómeno ocurre en células de la unión escamocolumnar de la zona de transformación del cuello uterino. En este caso, el virus induce proliferación celular sostenida de todas las capas del epitelio debido a una expresión anormal de las proteínas E6 y E7, con

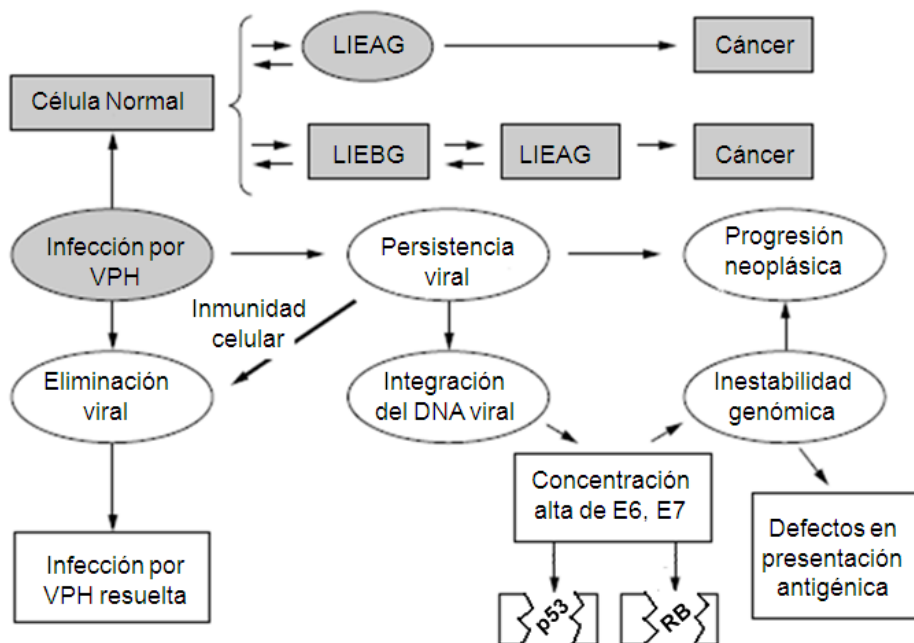
escasa o nula producción de las proteínas de la cápside y de partículas virales (véase *figura 4*). Una consecuencia de esta proliferación incontrolada es la inestabilidad genómica, que propicia la integración del genoma del virus en el genoma de la célula hospedera, proceso en el que el virus pierde totalmente la capacidad de suprimir las funciones proliferativas celulares estimuladas por E6 y E7. Estas dos condiciones, la inducción constante de proliferación de las células epiteliales y la pérdida del autocontrol de esta proliferación anormal, junto con acumulación de mutaciones y otros defectos genéticos, generan a largo plazo los cambios necesarios que conducen al cáncer.



**Figura 4. Cambios en los patrones de expresión a lo largo de la progresión hacia CaCU.** Durante la progresión a CaCU el patrón de la expresión viral cambia. En NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical) (LIEBG), el orden de los eventos es generalmente similar al ocurrido en las lesiones productivas (a la izquierda). En NIC 2 y 3 se retarda el desenlace de los eventos, y aunque conservan el mismo orden, la producción de viriones se concreta a áreas cada vez más pequeñas, cercanas a la superficie del epitelio. La integración de secuencias de VPH en el genoma del hospedero puede generar ciertos cambios que puedan llevar a la desregulación en la expresión de E7, así como a la pérdida de las proteínas E1 y E2. En CaCU, ya no son soportados los estadios productivos del ciclo de vida del virus y los episomas virales usualmente se pierden (Modificado de Doorbar, 2006).

La gran mayoría de las infecciones son asintomáticas o subclínicas, no originan ninguna manifestación clínica o morfológica y pasan desapercibidas, a no ser que se haga una prueba molecular para detectar fragmentos del genoma en las células infectadas. Casi todas las infecciones son transitorias, pues son controladas por la respuesta inmune, con sólo entre un 10% y un 20% de las mismas alcanzando a volverse persistentes y por ende las de mayor potencial oncogénico<sup>24</sup>.

Aunque algunas infecciones por VPH se presentan de manera subclínica, se sabe que la progresión de éstas se encuentra relacionada cercanamente con la persistencia del DNA viral, lo cual se explica extensamente en el siguiente esquema (figura 5)<sup>9</sup>.



**Figura 5. Mecanismo de carcinogénesis por VPH.** La persistencia del DNA viral viene acompañada de la ruptura de éste, entre los genes E1/E2 y la posterior integración del DNA viral en la célula. La ruptura de E2 libera los promotores virales de los oncogenes E6 y E7, lo que incrementa la producción de las proteínas oncogénicas codificadas por éstos. Las proteínas virales E6 y E7 son capaces de degradar selectivamente las proteínas celulares p53 y Rb, respectivamente, llevando a inactivar la función de estos dos importantes genes supresores de tumores. LIEAG, lesión intraepitelial de alto grado; LIEBG, lesión intraepitelial de bajo grado. (Modificado de Bosch *et al.*, 2002).



### 1.3 Tratamiento en México.

La Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 expone los lineamientos a seguir en el caso de infección por VPH, desde alteraciones citológicas hasta CaCU. A saber:

- i. Las pacientes con resultado compatible con imagen citológica de infección por VPH, deberán enviarse a una clínica de displasias para diagnóstico colposcópico, biopsia dirigida, tratamiento y seguimiento. En caso de encontrarse citología con resultados de displasia leve, moderada o grave *in situ* (neoplasias intraepiteliales cervicales o NICs grados 1, 2 y 3), de inmediato deben ser canalizadas a estudio colposcópico y biopsia dirigida a una clínica de displasias, para confirmar diagnóstico y en su caso realizarse tratamiento conservador con criocirugía, laserterapia o electrocirugía.
- ii. Las pacientes a las que se les hayan realizado estudios citológicos que muestren resultados de citología compatible con carcinoma micro-invasor, deberá pasar a una clínica de displasias para estudio colposcópico y biopsia dirigida; si esta última confirma micro-invasión se derivará al centro oncológico.
- iii. Las pacientes con infección por VPH o con displasia (NIC) pre-menopáusica con colposcopia satisfactoria, deben tratarse conservadoramente (criocirugía, electrocirugía o láser), en una clínica de displasias.

- iv. El control y tratamiento de las pacientes con infección por VPH o NIC asociado a embarazo, deben de ser valoradas en la clínica de Displasias. Se mantendrán en vigilancia y su tratamiento será después del puerperio, siempre y cuando se descarte la posibilidad de cáncer invasor. La conducta a seguir al término del embarazo, requiere la operación cesárea, ya que existe un riesgo de infección por VPH en el tracto aerodigestivo del recién nacido, detectado en 2.3% por medio de hibridación de ácidos nucleicos y 30% por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) <sup>25</sup>.

#### **1.4 Vacunas disponibles.**

Recientemente se concluyeron ensayos clínicos para probar dos tipos de vacunas contra los tipos virales más frecuentes. Por un parte, las vacunas profilácticas, cuya meta de es prevenir la infección primaria o persistente del VPH y, en consecuencia, prevenir las lesiones pre-invasoras y el cáncer cervical, esencialmente a través de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra epítopes de las proteínas de la cápside (L1 y L2) de los VPHs. Por otra parte, las vacunas terapéuticas que surgieron con el objetivo de prevenir la progresión de infecciones por VPH, inducir la regresión de lesiones pre-invasoras y el cáncer invasor, mediante la estimulación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos contra epítopes de las proteínas oncogénicas E6 y E7, que son indispensables para lograr el fenotipo tumoral y se expresan constitutivamente en las células cancerosas<sup>27, 28</sup>.

Las campañas de detección oportuna de CaCU en países en vías de desarrollo no han alcanzado una cobertura amplia de las mujeres en riesgo y han sido ineficientes para modificar el perfil epidemiológico de esta neoplasia. En ellos se mantienen elevadas tasas de incidencia y mortalidad por CaCU, postulándose que la vacunación profiláctica y terapéutica pudiera contribuir significativamente a la prevención y tratamiento del CaCU<sup>27</sup>.

### **1.5 Taxonomía del VPH.**

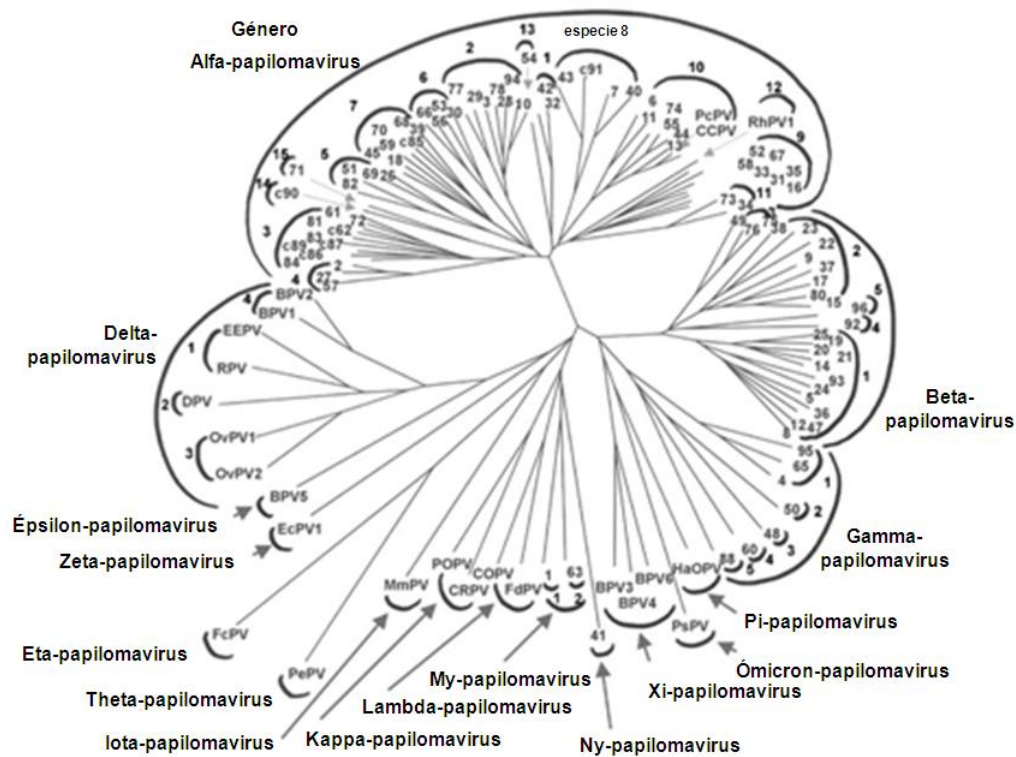
En sus primeros años, la taxonomía de los papilomavirus (PVs) se basaba en hibridación cruzada con sondas de ADN y mediante patrones de restricción, en los que se comparaban fragmentos subgenómicos o secuencias de genomas completos en un sistema de algoritmos filogenéticos<sup>41</sup>.

Existe evidencia de que el genoma de los PVs es muy estático y los cambios en su secuencia por mutaciones o recombinaciones son eventos muy raros. Por lo tanto, se postula que los cambios mutacionales ocurren a frecuencias no muy diferentes a las del genoma del hospedero.

Debido a que el marco de lectura L1 de los PVs posee una secuencia altamente conservada, desde la década de los noventa ha sido usado tanto para tipificar el virus en pacientes, como para la identificación de nuevos tipos<sup>6</sup>. Así, un nuevo tipo viral se define como una secuencia genómica completa con una organización típica de los papilomavirus y cuya secuencia del gen L1 difiere en al menos un 10% con el de cualquier otro tipo de PVs. Luego, en la década de 1980 se introdujo el término subtipo, que se definió en sus inicios como un

aislado que lograba hibridar con algún tipo conocido de PV, pero que su patrón de restricción difería con aquél. Este término quedó redefinido como una variación en el ORF L1 de entre el 2% y el 10%<sup>7</sup>.

Se ha establecido el término género para agrupar a las especies de PVs que están filogenéticamente relacionadas, aunque algunas veces estén muy diversificadas biológicamente; más aun así compartan características específicas en su organización genómica. Especie también es un término biológicamente útil para organizar grupos de PVs que se encuentran cercanos filogenéticamente y que se sabe comparten propiedades tanto biológicas como patológicas<sup>6</sup>.



**Figura 6. Clasificación de los papilomavirus.** Los semicírculos externos identifican los géneros de papilomavirus. Los números en el lado convexo de los semicírculos pequeños se refieren a las especies de papilomavirus. (Modificada de de Villiers, *et al.*, 2004).

Alrededor del mundo se han aislado variantes genómicas de los PVs, las cuales se ha reportado que no difieren en más del 2% dentro del mismo tipo viral. Al compararlas haciendo uso de árboles filogenéticos es posible darse cuenta de que no se presentan discontinuidades en los clados (*véase figura anterior*).

Con lo anterior, se ha postulado que la evolución de los tipos de PVs aparentemente antecede a la evolución del *Homo sapiens*, mientras que las variantes están ligadas al aislamiento geográfico de los diferentes grupos humanos<sup>8</sup>.

Tanto para variantes del VPH 16 como para las del VPH 18, se ha encontrado una topología en sus árboles filogenéticos similar a la que presentan las tres principales razas de seres humanos, africana, caucásica y asiática del este. Esto refuerza la probabilidad de que los VPHs hayan co-evolucionado con los grupos humanos en vez de sólo generar variantes por aislamiento geográfico. A pesar de la evidencia, no se debe descartar la reciente transmisión entre los grupos étnicos, dado que existe suficiente evidencia de la exposición entre miembros de diferentes grupos<sup>19, 26</sup>.

Casos típicos de esta evolución en variantes se encuentran en muchos tipos de VPHs, siendo mejor estudiados en los que provocan la mayor cantidad de lesiones cervicales, como en el caso de los VPHs 16 y 18<sup>12, 13</sup>.

## 1.6 Aislamiento e identificación viral

En los inicios de la identificación de los factores causantes del CaCU se requirió de diversas técnicas moleculares de hibridación, tales como la hibridación de DNA tipo Southern, con la cual era posible darse una idea del agente infeccioso que portaba la paciente, aunque para el caso del VPH solo nos permitía distinguir hasta el nivel de tipo viral infectante<sup>6</sup>.

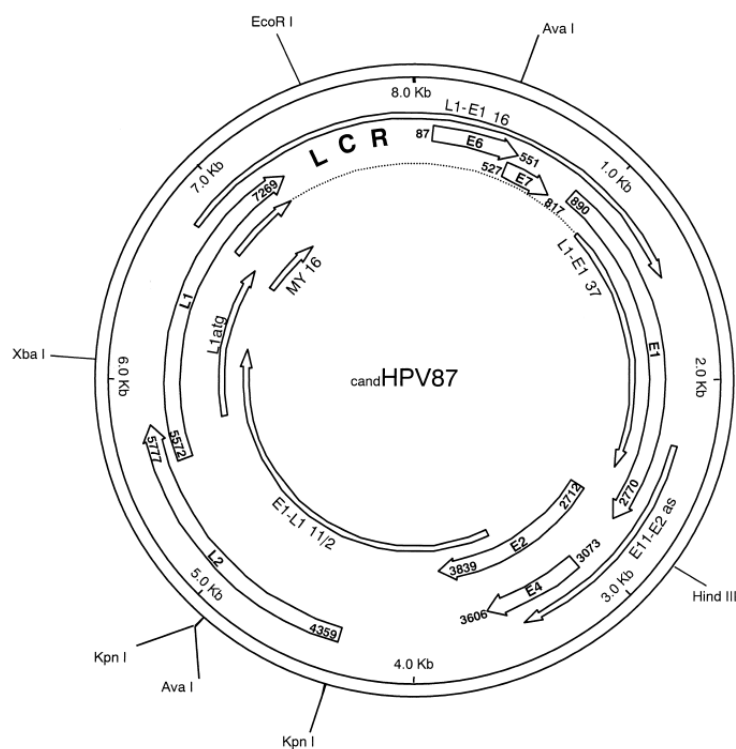
Con el advenimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), a mediados de la década de 1980, se pudieron identificar algunos cientos de PVs putativos, gracias al diseño de iniciadores consenso que alineaban principalmente sobre los ORFs L1 y E1<sup>6, 10</sup>.

La clonación convencional de genomas completos de PVs se ha dificultado, ya sea por la limitada cantidad del material recuperado de las muestras disponibles para las manipulaciones de laboratorio requeridas, o por la dificultad intrínseca para obtener genomas completos de PVs para ser propagados en vectores donde se ha intentado clonarles. Esto ha llevado a los investigadores a obtener múltiples regiones genómicas superpuestas para poder obtener finalmente la secuencia del genoma completo de los PVs que estén siendo investigados<sup>10, 29</sup>.

En un estudio llevado a cabo en 1996 se demostraron las dificultades de amplificación por PCR larga para ambas mitades del genoma viral, separadas por los genes E1 y L1, optando en ese caso por el diseño de un par de iniciadores en una pequeña región conservada de E4,<sup>30</sup> consiguiéndolo finalmente en tres fragmentos sub-genómicos.

Se han usado diversas estrategias de amplificación y clonación en un esfuerzo por encontrar nuevos tipos de PVs (véase figura 7). Se sabe que pacientes inmunocomprometidos, ya sea coinfectados con HIV o depletados de células CD4, son susceptibles a infecciones oportunistas, habiendo hallazgos muy importantes en cuanto a nuevos agentes etiológicos y genotipos virales.<sup>10</sup>

De superarse estas limitaciones metodológicas, la caracterización detallada del genoma de los VPHs, especialmente del tipo 16, su organización genómica y el análisis comparativo de su secuencia nucleotídica, podría revelar información muy valiosa acerca de su tropismo por ciertos tejidos y su riesgo carcinogénico.<sup>29</sup>



**Figura 7. Organización genómica y clones obtenidos por PCR de *candHPV87* (por su nomenclatura en inglés).** Los marcos de lectura del candidato se representan en las flechas gruesas, cuyos números representan las posiciones de los codones de inicio y terminación; las clones obtenidas se representan en flechas delgadas. (Nótese la cantidad de hasta seis amplicones utilizados).<sup>10</sup>

## **1.7 ANTECEDENTES**

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo diversos estudios relacionados con la epidemiología, biomarcadores moleculares, variantes virales y epigenética del VPH, tanto en displasias como en tumores.

### **1.7.1 Epidemiología.**

En los albores de la investigación sobre VPH y CaCU en nuestro laboratorio, se realizaron detecciones por hibridación en mancha para discriminar muestras positivas para VPHs de aquellas que eran negativas, seguido de análisis por Southern blot para determinar el tipo de VPH infectante. Un estudio pionero realizado por González-Garay y colaboradores en 1989, comparó mujeres asintomáticas infectadas con VPH 16 con aquellas que ya presentaban NICs y CaCU, encontrándose una relación inversa entre el estadio de la enfermedad y la presencia del ADN viral.<sup>41</sup>

En el verano de 2002, nuestro Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular realizó otro estudio pionero con la ayuda del Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario como la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León, que buscaba conocer la incidencia del VPH en la población general del área metropolitana de la ciudad de Monterrey. Habiendo encuestado a casi 5,000 mujeres que acudían a consulta por un motivo ajeno al estudio a consulta en las clínicas de las Jurisdicciones de la referida Secretaría, se incluyeron en este estudio a 3084 mujeres asintomáticas. Al buscar el VPH en cepillados cervicales se encontró que el 20% de dichas mujeres presentaban el virus, siendo los tipos más prevalentes el 59, 52, 16, 31 y 18.



### **1.7.2 Variación genética y epigenética.**

Calleja-Macías y colaboradores en 2004, investigaron la variación del genoma viral y la metilación en una muestra de los bioespecímenes positivos para VPH arriba descritos. Se incluyeron 1282 de las 3084 muestras cervicales y al re-tipificarlas resultaron aun positivas para la infección con VPH el 25% y las variantes virales prevalentes referentes a la especie 9 de VPH, resultaron ser los VPHs 16, 31 y 35, mientras que de la especie 7, el VPH 18. Para el primero (VPH 16), encontraron 14 variantes europeas y 98 asiático-americanas, mientras que para el último (VPH 18) se encontraron 13 europeas y 2 africanas. Para el caso del VPH 31 se logró agrupar en 2 ramas filogenéticas europea y áfrico-americana, mientras que finalmente para el VPH 35 se evidenciaron diversos grupos filogenéticos. Estudiando el patrón de metilación para muestras positivas para la infección con VPH 16, se encontró que la metilación de las islas CpG principalmente es, en general, más alta en CaCU que en NIC.

### **1.7.3 Factores de riesgo no-genéticos.**

Fajardo-Ramírez en el 2006, exploró factores y co-factores de persistencia de las infecciones por VPH. Incluyó para su estudio a 129 mujeres de las 600 arriba referidas, halladas asintomáticas pero positivas para VPH en el 2002. Para este nuevo estudio se les tomó otro cepillado cervical donde se encontró que el 20.9% aun presentaban infección con el VPH. De ellas, el 51.9% presentaba una infección con el mismo tipo viral de tres años atrás, es decir, se trataba de una infección persistente. De estas, casi la mitad (42.9%) desarrolló algún tipo de lesión. Factores como la edad de la primera relación

sexual, la edad durante el primer embarazo, el consumo de suplementos vitamínicos, la infecciones múltiples, co-infecciones con VPHs de bajo riesgo oncogénico y la referencia de un estado civil diferente al de casada resultaron de riesgo para la persistencia de la infección con el VPH. Finalmente, se concluyó que la infección con el VPH es una infección transitoria ya que la mayoría de las mujeres logran eliminar la infección sin tratamiento alguno (87.9%).

#### **1.7.4 Biomarcadores.**

##### **1.7.4.1 Biomarcadores de susceptibilidad al VPH.**

En el estudio de Bernal-Silva del 2007 (*datos aún no publicados*), donde se visitaron por segunda ocasión a 188 mujeres de entre las que habían sido encontradas positivas para el VPH en el 2002. Esta vez se reveló como el tipo viral más prevalente al tipo 83. Además de estudios de gabinete, se llevó a cabo la extracción del DNA genómico a partir de muestras de sangre para el estudio de los alelos DQ y DR del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMHII). En este otro estudio se advirtió que el 72% de las mujeres logró eliminar la infección viral. Finalmente se observó una tendencia significativa a la persistencia viral en quienes presentaban los alelos DQB1\*0609/18, DQB1\*0501, DQB1\*0301/13 y el alelo DQB1\*0202.

##### **1.7.4.2 Biomarcadores de eliminación de la infección por VPH.**

Por otra parte, Luévano-Salinas en el 2008 (*datos aún no publicados*), dio seguimiento a 157 mujeres de las positivas en el 2002, y abrió un nuevo grupo de estudio al que denominó “lesiones” (pacientes que presentaban

lesiones intraepiteliales), el cual sirvió como control positivo (52 mujeres). A dichas mujeres se les realizó una encuesta que incluyó la historia clínica y cofactores de riesgo, recolección de tubos de sangre, cepillados cervicales así como estudios de Pap y colposcopia. A partir del cepillado cervical se detectó y tipificó el VPH. Con la información generada previamente por Bernal-Silva sobre los alelos HLA en el grupo de “seguimiento”, se realizó el análisis de asociación entre estos y la presencia de anticuerpos. Se determinaron las frecuencias de la infección por VPH en ambos grupos de estudio (48.1% en “lesiones” y 30.1% en “seguimiento”). Los resultados de seroprevalencias fueron del 66% en el grupo “seguimiento” y del 35% en el grupo “lesiones”. Al dividir el grupo de seguimiento según la persistencia viral, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la seroprevalencia. Finalmente, se encontró que la reactividad de los anticuerpos en el suero de dichas mujeres contra un subconjunto de proteínas virales en particular, podría servir como biomarcador de eliminación viral, ya que se encontró que la respuesta inmune humoral parece estar disminuída en mujeres con persistencia viral y presencia de anormalidades citológicas.

## **1.8 JUSTIFICACIÓN**

Las investigaciones sobre VPH en nuestro laboratorio han abarcado la detección tipos y variantes virales, la prevalencia de estos en infecciones y tumores, así como aspectos genéticos, inmunológicos, ambientales, epidemiológicos y otros. Los métodos de genotipificación han sido diversos y no siempre coincidentes. En general, las muestras se agotan durante el análisis y no se alcanza a obtener la secuencia completa del genoma viral, con la que se respondería a más preguntas. Además, ha faltado integrar en una sola base de datos la información relevante generada en estas investigaciones. El clonar, caracterizar y resguardar en el biobanco los genomas virales de bioespecímenes positivos para VPHs, así como disponer de la información relevante asociada a estos, garantizaría su máximo aprovechamiento y beneficios para las pacientes.

## **CAPÍTULO II: OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Diseñar, implementar y validar una estrategia para la clonación y caracterización del genoma de los VPHs en bioespecímenes clínicos, que permita el buen resguardo de dicho material genómico y su mejor aprovechamiento como materia prima de investigación y recurso biotecnológico.

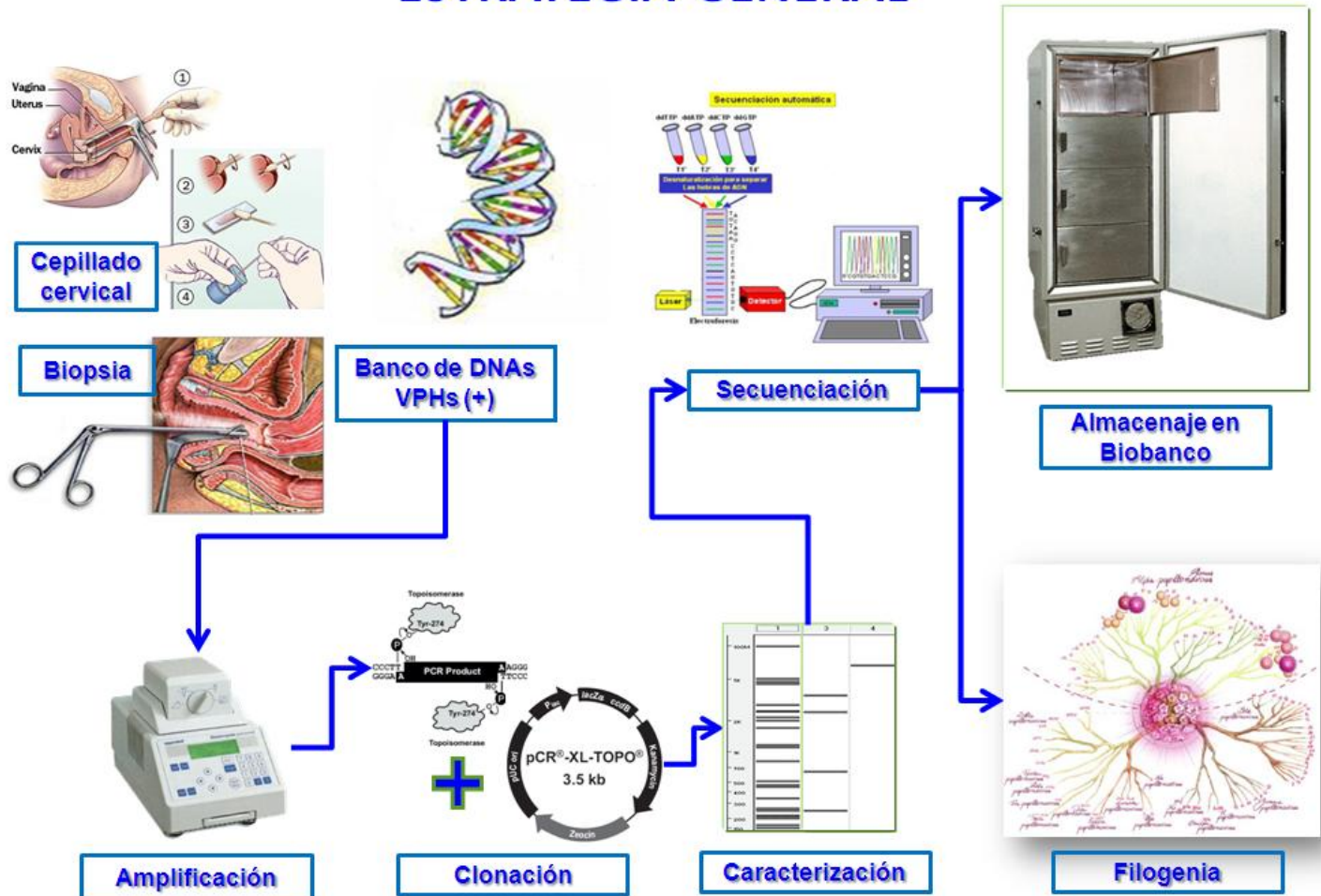
### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diseñar una estrategia para la amplificación y clonación de genomas de VPHs presentes en bioespecímenes.
2. Detectar y caracterizar las clonas generadas, incluyendo la obtención de sus secuencias nucleotídicas.
3. Comparar las secuencias obtenidas con las reportadas en Genbank para realizar análisis filogenéticos.
4. Resguardar las clonas obtenidas y los datos relevantes asociados a las mismas en el biobanco de la Unidad de Biotecnología Médica (UBM), para su futuro aprovechamiento biomédico y biotecnológico.

## CAPÍTULO III: ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia general para desarrollar el presente trabajo comprendió varias etapas (véase figura 8).

## ESTRATEGIA GENERAL



**Figura 8. Estrategia general.** El estudio comprendió las etapas de amplificación de los fragmentos de ~3Kb y ~5Kb de los genomas virales, clonación de estos en un vector de propagación, caracterización enzimática, secuenciación, análisis bioinformático de las secuencias obtenidas y finalmente, el almacenaje de los bioespecímenes y de la información recobrada en el biobanco del Departamento donde se realizó el presente estudio.

Los bioespecímenes provinieron de una cohorte de pacientes positivas para la infección con VPH y citología anormal, que han venido reclutándose para constituir el grupo “Lesiones” de la línea de investigación sobre cáncer cérvico uterino, cuyo estudio y seguimiento se realiza en nuestro Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en colaboración con varios Servicios del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

El estudio se apoyó en la PCR larga utilizando dos pares de iniciadores diseñados en zonas consenso del genoma viral, capaces de amplificar éste en dos fragmentos traslapados de ~5 y ~3 kb. Se optó por dividir el genoma viral así, dadas las dificultades encontradas por otros grupos de investigación al intentar clonar el genoma viral completo en un solo paso.

Se utilizó el DNA genómico total extraído de las células de cérvix de las pacientes, encontrándose diluido en éste el DNA viral que se utilizó como templado. Los amplicones ya sea de ~3Kb ó ~5Kb fueron ligados en el vector pCR® TOPO® XL; acto seguido, los productos de ligación fueron usados para transformar bacterias *E. coli* de la cepa TOP 10 electrocompetentes y los plásmidos recombinantes portados por las cepas positivas fueron recuperados de estas utilizando la técnica de lisis alcalina<sup>14</sup>. Una vez obtenidos éstos, se procedió a verificar su integridad y calidad, sometiendo alícuotas de los mismos a análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se realizó la caracterización por análisis de restricción para confirmar rápidamente el tipo viral.

El procedimiento culminó con la secuenciación nucleotídica, con lo que quedó confirmada la identidad de los fragmentos subgenómicos clonados. Para esto último se echó mano de iniciadores consenso diseñados para alinearse convenientemente a lo largo de dichos sub-genomas, de tal manera que las secuencias con ellos generadas se traslapasen y así cubriesen el genoma viral. Se concluyó realizando un análisis filogenético de las secuencias genómicas virales, almacenando estas en una base de datos y los bioespecímenes en el Biobanco del Laboratorio del Departamento donde se realizó el presente estudio.



## CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Material.

#### 4.1.1 Estuches.

El estuche de PCR Largo Master Amp<sup>™</sup> Extra-Long PCR Kit utilizado en esta investigación fue suministrado por Epicentre<sup>®</sup> Biotechnologies (Madison, WI, E.U.A.). El estuche de clonación TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit por Invitrogen<sup>™</sup> (Carlsbad, CA, E.U.A.). Para la purificación de las bandas de PCR se utilizó el estuche Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega Corporation (Madison, WI, E.U.A.). Utilizamos en la secuenciación el estuche BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems (Foster City, CA, E.U.A.).

#### 4.1.2 Reactivos y consumibles.

Para PCR convencional se adquirió la enzima DNA polimerasa GoTaq, el MgCl<sub>2</sub> y amortiguador 10X de Promega Corporation (Madison, WI, E.U.A.), los dNTPs de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, E.U.A.) y los iniciadores de Invitrogen<sup>™</sup> (Carlsbad, CA, E.U.A.) y Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, E.U.A.). El medio de cultivo utilizado fue Lysogeny broth (LB) de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, E.U.A.) de los que adicionalmente se adquirió la kanamicina. La agarosa fue suministrada por Invitrogen<sup>™</sup> (Carlsbad, CA, E.U.A.). Tanto las puntas para micropipeta como los microtubos utilizados en esta investigación, fueron comprados en Axygen, Inc. (Union City, CA, E.U.A.). Las enzimas de restricción *Eco* RI, *Hind* III y *Pst* I usadas en los análisis de patrones de corte,

provinieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA), así como sus respectivas soluciones amortiguadoras. Las celdas para electroporar modelo Gene Pulser<sup>®</sup> E.coli Pulser<sup>®</sup> se adquirieron en Bio-Rad (Hercules, CA, E.U.A.). Para rellenar la columna capilar del secuenciador, se utilizó el polímero POP-7<sup>™</sup> de Applied Biosystems (Distrito Federal, México).

#### **4.1.3 Material biológico.**

Se utilizó DNA extraído de células de cérvix de pacientes, previamente tipificadas positivas para VPH 16, quienes presentaban un resultado anormal en su citología. También la cepa *E. coli* TOP10 suministrada por el proveedor del estuche de clonación TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit de Invitrogen<sup>™</sup> (Carlsbad, CA, E.U.A.).

#### **4.2 Equipo.**

El juego de micropipetas Eppendorf Research y el termociclador Mastercycler gradient que se utilizaron para ejecutar las PCRs provinieron de la compañía Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania). Para el análisis de los amplicones obtenidos fue necesaria la cámara de electroforesis horizontal Owl modelo B2 de Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, E.U.A.) adaptada a la fuente de poder Gibco BRL 500 (Gaithersburg, MD, E.U.A.). Posteriormente se capturaron los resultados de la electroforesis en el fotodocumentador Gel Doc 1000 de Bio-Rad (Hercules, CA, E.U.A.). El electroporador Gene Pulser II proveniente de Bio-Rad (Hercules, CA, E.U.A.) se utilizó para transformar las bacterias. Los reactivos que así lo requerían fueron pesados en la balanza analítica

Adventurer SL AS313 adquirida de Ohaus Corp. (Pine Brook, NJ, E.U.A.). El espectrofotómetro usado en las cuantificaciones fue el Biophotometer de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania), de donde también se compró el Thermomixer 5436 y la microcentrífuga modelo 5412. Para fundir la agarosa se utilizó horno de microondas GoldStar modelo MA-875M. El almacenaje de los bioespecímenes se llevó a cabo en un congelador Torrey de -20°C (Mty., México) o en un ultra-congelador de -70°C de So Low Environmental (Cincinnati, OH, E.U.A.), según la naturaleza de la muestra. Las secuencias se obtuvieron en el equipo AB 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (D.F., México).

#### **4.2.1 Programas bioinformáticos.**

Con el objetivo de diseñar los iniciadores para la PCR larga a fin de amplificar tanto los fragmentos de ~3Kb, como los de ~5Kb, se recurrió al programa Oligo 6.40<sup>®</sup> de Molecular Biology Insights, Inc. (Cascade, CO, E.U.A.), siendo cargado con secuencias modelo de la mayoría de los VPHs disponibles en GenBank. Para obtener modelos de los vectores con el inserto esperado se utilizó el programa Vector NTI<sup>®</sup> Suite 9 de Invitrogen<sup>™</sup> (Carlsbad, CA, E.U.A.), en cuya base de datos también fueron cargadas las secuencias para ayudar al diseño de los experimentos *in silico*. Este programa fue útil tanto para los diseños de los vectores, como para los análisis de los patrones de restricción. Para el análisis y edición de las secuencias se utilizó el programa Sequencing Analysis<sup>™</sup> 5.3.1 de Applied Biosystems (Foster City, CA, E.U.A.). Las comparaciones entre las secuencias fueron realizadas con BLAST<sup>15</sup> (Basic

Local Alignment Search Tool) y CLUSTALW<sup>17</sup>. Cap3 fue útil para el ensamblaje de las secuencias<sup>16</sup> y finalmente VecScreen<sup>18</sup> para descartar contaminación de la secuencia con vector.

### 4.3 Métodos.

#### 4.3.1 Diseño de iniciadores utilizados en este trabajo.

Para diseñar los oligonucleótidos se utilizaron los programas Oligo 6.40<sup>®</sup>, Amplify 3.1.4 para Mac OS X y Vector NTI<sup>®</sup> Suite 9. Se emplearon dos pares de iniciadores para la realización de este trabajo. Para amplificar un fragmento de ~5Kb se partió de zonas altamente conservadas en el genoma de cuatro VPHs de especies diferentes, los cuales fueron alineados para obtener una secuencia consenso con la menor cantidad de nucleótidos degenerados posible. De las zonas consenso encontradas, se escogieron las ubicadas en los genes E1 y L1. Los otros iniciadores utilizados para amplificar el fragmento de ~3Kb, existían ya reportados en la literatura y eran utilizados para detección y tipificación viral.

**Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores utilizados en el estudio de los cuales los 2 primeros fueron diseñados por el autor.**

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	DETALLES
<b>1FW</b>	AACCWCCAAAATTGCGWAG	Tiene su blanco en el gen E1
<b>14REV</b>	CGGCCHAARGGAWAYTGATC	Tiene su blanco en el gen L1
<b>MY 11</b>	CGTCCMARRGGAWACTGATC	Tiene su blanco en L1
<b>CPI</b>	ATGGTACARTGGGCATWTGATA	Tiene su blanco en E1

#### **4.3.2 Clonación de los productos amplificados.**

Los productos amplificados de ~3Kb ó ~5Kb se clonaron en el vector comercial pCR<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> XL de Invitrogen<sup>™</sup>, de acuerdo a las condiciones que recomendó el fabricante de TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit.

#### **4.3.3 Condiciones de reacción y estandarización en PCR larga de ~3Kb.**

La estandarización de la PCR larga para el fragmento viral de ~3Kb se realizó utilizando cada una de las nueve Pre-mezclas 2X (contiene amortiguador Extra-Long PCR 2X, 400 mM de cada dNTP, concentraciones de Mg<sup>2+</sup> de 3 a 7 mM y betaína) que suministra el fabricante y variando las concentraciones de DNA genómico en la mezcla de reacción de la PCR, temperatura de alineamiento de los iniciadores y los tiempos de extensión, logrando así establecer como óptimas las condiciones de reacción aquí descritas. El cuadro 2 describe la composición de la mezcla de reacción con un volumen final de 50 µl y el programa de amplificación se detalla en el cuadro 3. Los productos amplificados, junto con un marcador de peso molecular, se corrieron en un gel de agarosa al 1% para estimar su tamaño y posteriormente se caracterizaron con diferentes enzimas de restricción para identificar su origen.

**Cuadro 2. Condiciones de reacción de la PCR larga.**

Reactivo	Concentración final
Iniciador MY11 10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Iniciador CPI 5 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Polimerasa 2.5 U/ $\mu$ L	2.5 U
DNA genómico (VPH (+))	200 – 1000ng
Agua ultra-pura	csp 25 $\mu$ L

**Cuadro 3. Programa de amplificación de la PCR larga utilizando rampa de temperaturas de alineamientos.**

Pasos	Temperatura $^{\circ}$ C	Tiempo mm:ss
Desnaturalización	94	5:00
	94	1:00
Alineamiento	56 (-0.6/ciclo)	2:00
Extensión	72	3:45
18 ciclos		
Desnaturalización	94	1:00
Alineamiento	44	2:00
Extensión	72	3:45
22 ciclos		
Extensión Final	72	10:00

De forma similar se procedió para la amplificación del fragmento viral de ~5Kb. Se estandarizaron las condiciones de la PCR larga con el estuche Master Amp<sup>™</sup> Extra-Long PCR Kit. Este contiene nueve premezclas al doble de la concentración requerida (2X) que contienen: solución amortiguadora 2X, 400 mM de cada dNTP, concentraciones de Mg<sup>2+</sup> de 3 a 7 mM y diversas cantidades de betaína. El estuche fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Por lo anterior solo fue necesario variar la cantidad de DNA añadido y llegar a un volumen final de 50  $\mu$ L.

En el cuadro 4 se describe la composición de la mezcla de reacción con un volumen final de 50 µl y el programa de amplificación se detalla en el cuadro 5. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 1% para estimar su tamaño; acto seguido, se procedió a clonar los fragmentos en vector pCR<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> XL.

**Cuadro 4. Programa de PCR largo convencional con incrementos de tiempo de extensión.**

Pasos	Temperatura °C	Tiempo mm:ss
Desnaturalización	94	5:00
	94	00:30
Alineamiento	52	1:30
Extensión	72	6:00(+10s/ciclo)
12 ciclos		
Desnaturalización	94	1:00
Alineamiento	52	1:30
Extensión	72	6:00(+15s/ciclo)
23 ciclos		
Extensión Final	72	10:00

**Cuadro 5. Condiciones de reacción en PCR largo convencional.**

Reactivo	Concentración final
Iniciador 1FW 10µM	0.2µM
Iniciador 14REV 10µM	0.2µM
Polimerasa 2.5 U/µL	2.5 U
DNA genómico (VPH (+))	200 – 1000ng
Agua ultra-pura	csp 25µL

#### **4.3.4 Transformación de bacterias electrocompetentes.**

Para electroporar las bacterias se utilizaron 2 $\mu$ L de la reacción de ligación del vector con el amplicón diluidos en 20 $\mu$ L de agua ultra-pura. Se usaron los siguientes parámetros: 2.5 kV, 200  $\Omega$  y 25  $\mu$ F. Una vez generado el pulso, se transfirieron las bacterias a 800  $\mu$ l de LB y se incubaron a 37°C con agitación de 400 rpm por el lapso de una hora. Posteriormente 100  $\mu$ l de la suspensión de bacterias se sembró en placa de LB con kanamicina (50 mg/ml) y se llevó a incubar a 37°C durante 16 horas. La selección de colonia se hizo por PCR directo y comprobadas éstas, se transfirieron las colonias a tubos con LB con kanamicina y se crecieron a 37°C en baño con agitación durante 16 horas.

#### **4.3.5 Tamizaje de las clonas candidatas.**

Las clonas candidatas de la placa suplementada con kanamicina se tamizaron por PCR directo de colonia con la mezcla de iniciadores PGMY cuya diana en el ADN viral se encuentra en el gen L1, para su secuencia véase cuadro 7, esperando un amplicón de 450 pb. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando DNA polimerasa Go Taq (Promega). Se realizaron múltiples ensayos a fin de optimizar las condiciones de PCR para la amplificación de una región del gen L1 común tanto para el fragmento de ~3kb, como para el de ~5kb. El resultado de esta estandarización se muestra en el cuadro 6. La mezcla de reacción fue ajustada con agua ultra-pura a volumen final de 30  $\mu$ L.



**Cuadro 6. Condiciones de reacción para PCR directo de colonia con iniciadores PGMY.**

Reactivos	Concentración final
Amortiguador 5X	1X
Mg <sup>2+</sup> 25mM	4mM
dNTPs 10mM	200µM
Iniciador PGMY 09 2µM	0.2µM
Iniciador PGMY 11 2µM	0.2µM
Polimerasa 2.5 U/µL	2.5U
Colonia bacteriana diluida en 10µL de H <sub>2</sub> O	10µL
Agua ultra-pura	csp 30µL

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, las amplificaciones se llevaron a cabo en 40 ciclos, consistentes cada uno de un paso de desnaturalización a 94°C por un minuto, uno de alineamiento a 55°C por un minuto y un tercero de extensión a 72°C por un minuto. Terminados los 40 ciclos, se programó un paso final de extensión a 72°C durante 5 minutos. El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

**Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores reportados PGMY. Estos iniciadores se usan comúnmente para la detección del DNA de numerosos tipos de VPH.**

Iniciador	Secuencia
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

Las clonas que resultaron positivas fueron crecidas a 37 °C en tubos con LB suplementado con kanamicina como medio selectivo y en agitación constante durante 16 horas. Sucedido esto, se procedió a la extracción de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina<sup>14</sup>.

#### **4.3.6 Técnica de lisis alcalina.**

Se centrifugaron 2 mL del cultivo bacteriano durante 5 min a 5,000 rpm y se removió el medio por decantación, se conservaron otros 2 mL para análisis posteriores y conservación por glicerinado. El DNA plasmídico se extrajo por el método de la lisis alcalina<sup>14</sup>. Las células se resuspendieron en 100 µl de solución I (glucosa a 50 mM, Tris-HCl a 25 mM y EDTA a 10 mM y pH 8) mezclando vigorosamente con el agitador mecánico. Se agregaron 200 µl de solución II (preparada en fresco mezclando 0.2 ml de NaOH a 10 N y 1.0 ml de SDS al 10% en 8.8 ml de agua), se mezcló inmediatamente por inversión e incubó en hielo por 5 min. Luego se agregaron 150 µl de solución III (acetato de amonio a 7.5 M), se mezcló de inmediato por inversión y se incubó por 5 min en hielo. Después se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo donde se le hizo una extracción fenol/Sevag 1:1. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo donde el DNA plasmídico se precipitó agregando dos volúmenes de etanol frío y mezclando por inversión. Luego de centrifugar a 14,000 rpm por 5 min, la pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% previamente enfriado y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El DNA plasmídico purificado se resuspendió en 50 µl de TE 1X (pH 8.0) con RNAsa a 20µg/ml.

#### **4.3.7 Verificación de la calidad del vector.**

Una vez obtenido el vector purificado se procedió a verificar su calidad, corriendo 2.5 µg de DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1%, cuya finalidad era encontrar más del 80% del DNA plasmídico como superenrollado lo cual

nos indicaba además de la relación 260/280 obtenida en el análisis espectrofotométrico, una buena calidad del plásmido extraído.

#### 4.3.8 Selección de clonas positivas por restricción.

Los vectores fueron caracterizados con enzimas de restricción (*Eco* RI y *Hind* III) comparándolas con los patrones esperados *in silico*. Para esto se llevó a cabo la digestión de 3 µg. Los plásmidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, utilizando como marcador de peso molecular el bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Pst* I. Los plásmidos recombinantes que mostraron el patrón esperado fueron seleccionados para conservar una alícuota del plásmido y una de bacterias.

#### 4.3.9 Secuencias de referencia utilizadas en este estudio.

En el siguiente cuadro se muestran las secuencias utilizadas en este estudio con sus respectivos números de acceso en Genbank. Una vez secuenciados los insertos de los plásmidos recombinantes portadores de los fragmentos de interés, sus secuencias fueron comparadas con las reportadas en GenBank con los números de acceso mencionados en el siguiente cuadro.

**Cuadro 8. Números de acceso de secuencias de VPH 16.**

Número de acceso	Descripción
AF534061	VPH tipo 16, variante del este asiático, genoma completo.
AF472508	VPH tipo 16, variante africana tipo 1, genoma completo.
AF472509	VPH tipo 16, variante africana tipo 2, genoma completo.
AF536179	VPH tipo 16, variante Europea alemana del aislado 131, genoma completo.

#### 4.3.10 Secuenciación.

Los insertos clonados fueron secuenciados usando 2.7 pmol M13 reverso y la misma concentración de M13 forward, usando para cada reacción 2 µL de la pre-mezcla Big Dye v3.1 en 10 µL de reacción de secuenciación. Se utilizaron otros iniciadores, con la misma concentración final, para completar la secuencia de interés de VPH 16 insertada en pCR® TOPO® XL (véase *cuadro 9*).

**Cuadro 9. Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de secuenciación de las clonas de interés.**

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	DETALLES
M13-FW	GTAAAACGACGGCCAG	Tiene su blanco en el vector
M13-RV	CAGGAAACAGCTATGAC	Tiene su blanco en el vector
E6-2 408	GCAACAAGACATACATCGACCG	Tiene su blanco en E6
E7-2 491	TTTCTGAGAACAGATGGGGC	Tiene su blanco en E7
E1-2 177	ACGTTGGCAAAGAGTCTCCA	Tiene su blanco en E1

Las condiciones de temperatura para la amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, las amplificaciones se llevaron a cabo en 50 ciclos, consistentes cada uno de un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, uno de alineamiento a 52°C por 10 segundos y un tercero de extensión a 60°C por 4 minutos. Terminados los 50 ciclos, el producto amplificado fue purificado por precipitación con etanol. Se añadieron 4µL de una solución de paro que contenía acetato de sodio 1.5 M y EDTA 50 mM, luego se añadió 2.5 volúmenes de etanol al 95% y se mezcló. Se dejó en hielo 15 minutos, para luego centrifugar por 15 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se agregaron 10µL de etanol al 70%. Se llevó a una breve

centrifugación y se aspiró el sobrenadante cuidadosamente. Finalmente se secó el pellet y se resuspendió en formamida. Posteriormente se cargó en la placa del secuenciador.

#### **4.3.11 Identificación de las secuencias virales clonadas.**

Las secuencias generadas en este estudio se compararon en el BLAST<sup>15</sup> con las secuencias disponibles en las bases de datos del GenBank, con el fin de determinar su identidad, fueron analizadas con el programa VecScreen para verificar que no hubiese contaminación con secuencias del vector.

#### **4.3.12 Ensamblaje de la región viral clonada.**

Las secuencias generadas en este estudio fueron ensambladas con el programa CAP3<sup>16</sup> en la medida en que se fueron obteniendo. Se utilizó adicionalmente la secuencia con número de acceso AF534061 reportada por Terai, M., et al., 2002, para la variante asiático americana del VPH 16 que se encuentra disponible en la base de datos del Genbank.

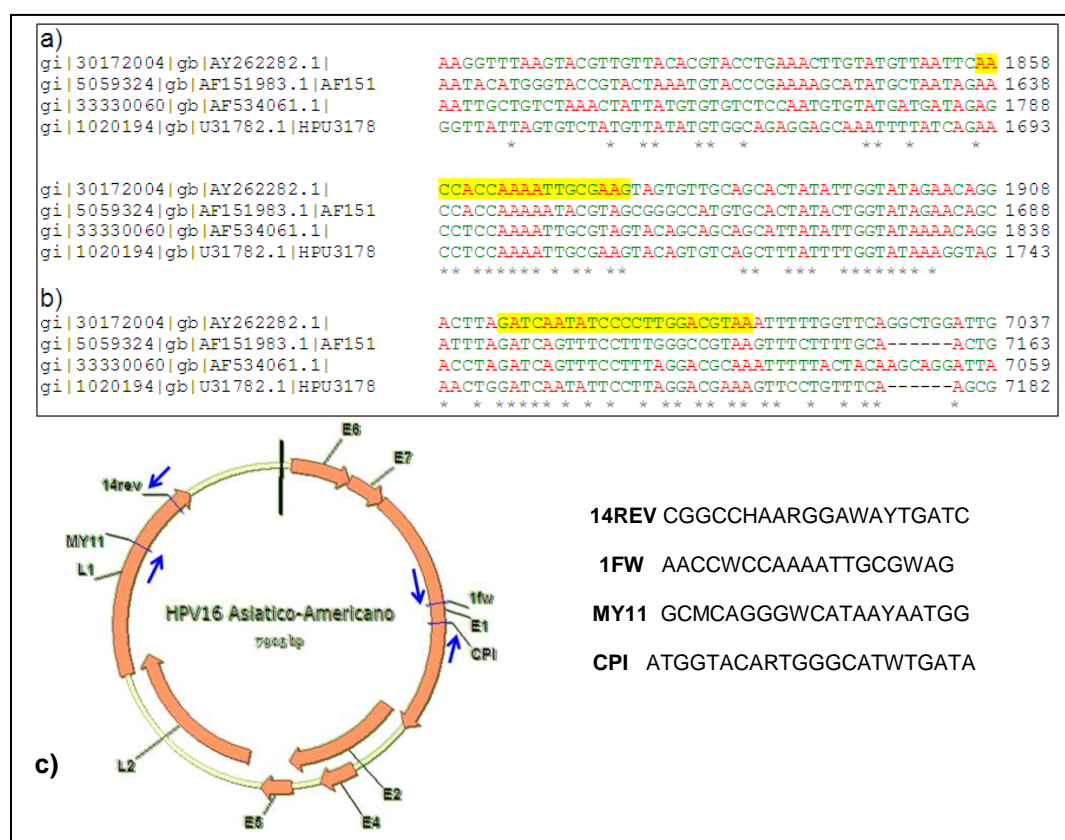
#### **4.3. 13 Análisis de las secuencias nucleotídicas.**

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo se alinearon con las reportadas en GenBank utilizando para ello el programa ClustalW<sup>17</sup> para determinar la similitud entre ellas.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS

### 5.1 Diseño de oligonucleótidos.

Se recuperaron de la base de datos de Genbank las secuencias de todos los VPHs reportados hasta el momento. Para el rastreo de zonas consenso se alinearon entre sí las secuencias nucleotídicas de cuatro especies distintas de VPHs, entre los que se encuentran los tipos 16, 18, 83 y 24. Con estas secuencias se diseñaron los iniciadores para la amplificación una primera porción genómica viral de ~5kb (véase figura 9).

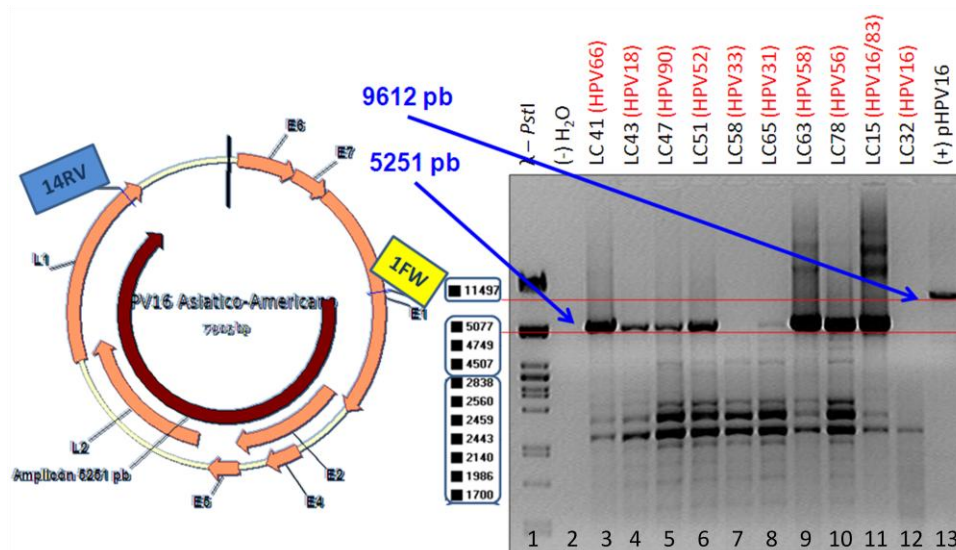


**Figura 9. Fragmentos del alineamiento de las secuencias de cuatro especies de VPH.** Se muestran las regiones consenso sobre las cuales se diseñaron los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento de ~5kb alineando los VPHs tipos 16, 18, 83 y 24. En a) la región del gen E1 sobre el cual se diseñó el iniciador 1fw. En b) la región consenso del gen L1 donde se diseñó el iniciador 14rev. En c) se muestra un mapa con las ubicaciones relativas de los iniciadores en el genoma de VPH 16 y una lista de los iniciadores utilizados en el estudio.

Para la porción restante del genoma viral, de ~3kb, fue posible utilizar los iniciadores CP1 y MY11, que están disponibles comercialmente para la detección de DNA de VPH en muestras de pacientes.

## 5.2 Amplificación del fragmento sub-genómico de ~5kb de VPH 16 y otros.

A partir del DNA extraído de pacientes que resultaron positivas para la infección con VPH, se probó que el par de iniciadores fuera capaz de amplificar el fragmento sub-genómico de ~5kb. Utilizando muestras positivas para VPH16, así como para otros tipos de VPHs, se amplificaron los fragmentos sub-genómicos de ~5kb. Los amplicones generados fueron verificados en un gel de agarosa al 1%, observándose una banda prominente de 5251 pb (*figura 10*).



**Figura 10. Resultado de la PCR larga para el fragmento de ~5kb.** A la izquierda se muestra una representación gráfica del genoma viral, donde se destacan las regiones a las que se unen los iniciadores (14RV y 1FW) utilizados para amplificar este fragmento. La flecha coloreada de mayor intensidad representa el amplicón de interés. A la derecha se muestra la electroforesis de los amplicones en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra como marcador de peso molecular el DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Pst* I; en el segundo carril el control negativo de la PCR y en el resto de los carriles el producto de ~5Kb amplificado a partir de muestras clínicas; en el último carril se encuentra como control positivo el amplicón de un plásmido que contiene el genoma de VPH16 insertado en pBR322. En la parte superior de los carriles se indica el origen de dichas muestras siendo analizadas.

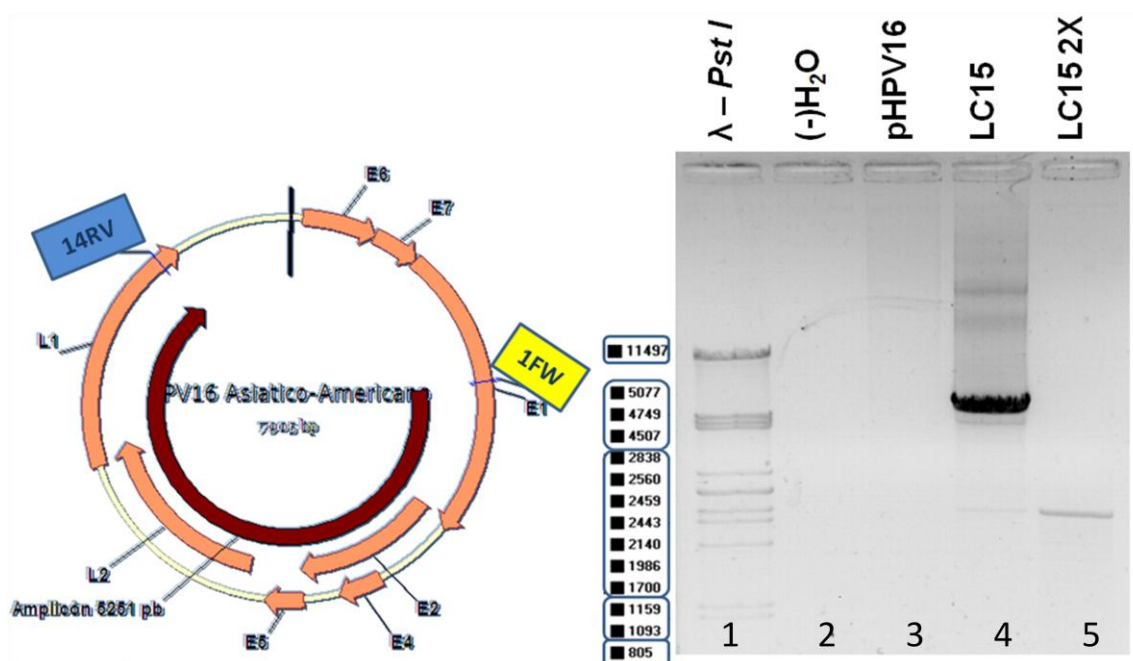


En los carriles del gel de la figura 10, se puede notar la presencia de bandas inespecíficas, por lo cual se fijó como la siguiente meta el variar las condiciones de temperatura de alineamiento y de concentración de DNA en la PCR, con el fin de privilegiar la amplificación de la banda única del tamaño esperado.

Al descubrir que el VPH 16 se encontraba en la mayoría de los bioespecímenes analizados y al tratarse este tipo viral del mayor causante del CaCU a nivel tanto regional como mundial, se optó por concentrar el presente trabajo en bioespecímenes positivos para VPH 16, por lo que en lo sucesivo se describirán los esfuerzos y logros obtenidos al aplicar esta metodología a pacientes positivas para este tipo viral.

### **5.3 Optimización de la PCR larga para la amplificación del fragmento sub-genómico de ~5kb.**

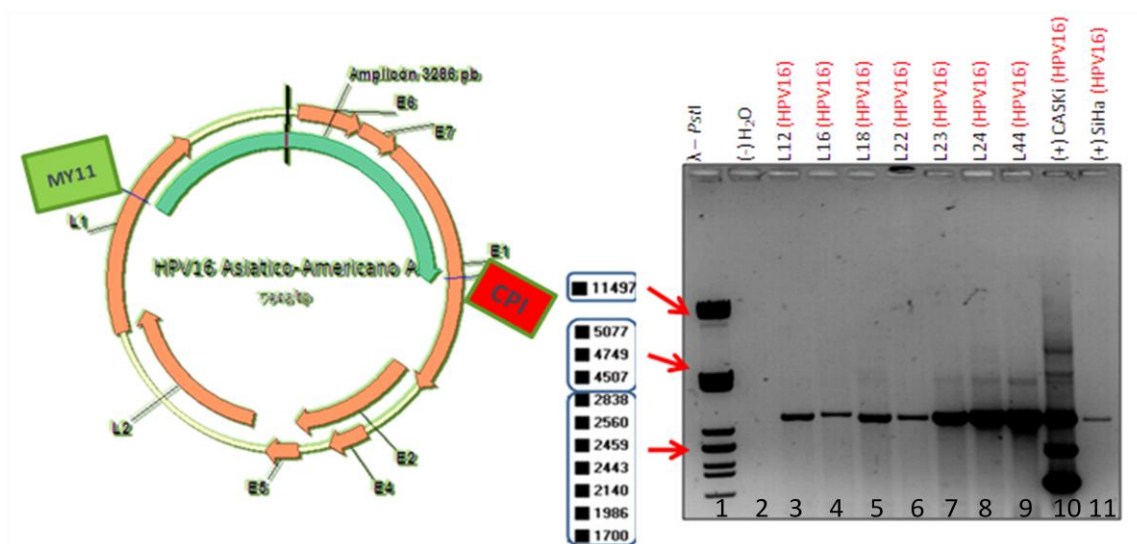
Modificándose las condiciones de temperatura de alineamiento y de concentración de DNA, se logró obtener una banda única correspondiente al fragmento de ~5kb, requerida para su posterior clonación en el vector de propagación pCR<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> XL. Para este experimento de estandarización se utilizaron diferentes cantidades de templado, correspondiente a la paciente LC15, la cual había sido encontrada positiva para VPH 16. De este DNA se utilizaron cantidades del DNA genómico de la paciente de 400 y 800ng. Observándose mejores resultados con la primera concentración (*figura 11*).



**Figura 11. Resultado de la PCR larga para el fragmento de ~5kb para LC15.** A la izquierda se muestra una representación gráfica del genoma viral, donde se señalan las regiones a las que se unen los iniciadores utilizados para amplificar este fragmento. La flecha más oscura representa el amplicón de interés. A la derecha se muestra la electroforesis de los amplicones en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio; en el primer carril se encuentra como en la figura anterior, el marcador de peso molecular  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Pst* I; en el segundo carril el control negativo de la PCR y en los carriles indicados como LC15 (400ng) y LC15 2X (800ng) se encuentran los amplicones de esta muestra, apareciendo la banda esperada solo en el primero.

#### 5.4 Amplificación del fragmento sub-genómico de ~3Kb de VPH16.

Usando la pre-mezcla 6 del estuche para PCR largo descrito en la página 27 de material y métodos se logró amplificar el fragmento de ~3Kb de VPH16 de las muestras de mujeres infectadas con este virus (véase figura 12).

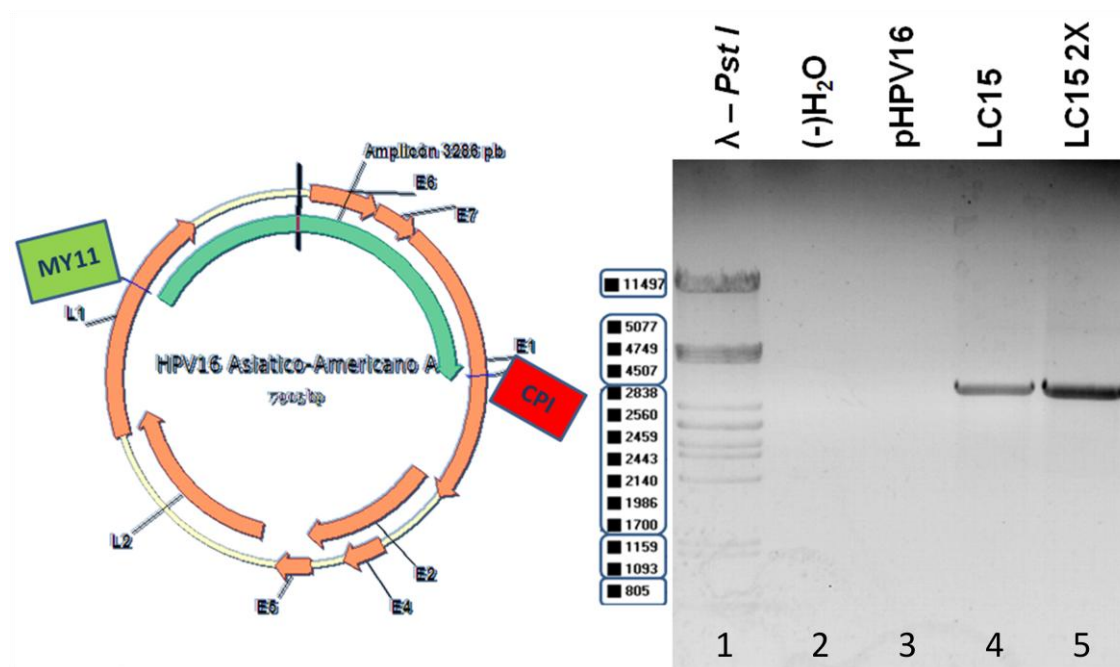


**Figura 12. Resultado de la PCR larga para el fragmento sub-genómico de ~3kb.** A la izquierda se muestra el mapa del genoma de VPH 16, indicando los lugares donde se unen los iniciadores. La más larga de las flechas internas representa el amplicón de ~3kb esperado. A la derecha encontramos los amplicones producto de la PCR larga sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde el marcador de peso molecular es  $\lambda$  Pst I en el primer carril; el segundo carril corresponde a el control negativo de la PCR; y del tercero en adelante los amplicones provenientes de las muestras de pacientes. Se tomó como control positivo el DNA de las líneas celulares (VPH positivas) SiHa y CaSki mostradas en los dos últimos carriles.

Se utilizaron en esta ocasión dos controles positivos. En primer lugar se utilizó como plantilla el DNA proveniente de la línea celular SiHa, de la cual se sabe que contiene dos copias por célula de VPH 16. En segundo lugar se empleó DNA obtenido de la línea celular CaSki con 400 copias por célula de VPH 16. Este último rindió en el ensayo además del abundante amplicón esperado, otros inespecíficos. Sin embargo, las muestras de pacientes generaron amplicones con el tamaño esperado que en el gel aparecieron muy intensos (véase figura 12), por lo que se procedió a clonarlas en el vector pCR<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> XL.

### 5.5 Optimización de la PCR larga para la amplificación del fragmento sub-genómico de ~3kb.

Para estandarizar las condiciones de PCR adecuadas para la obtención de bandas únicas con densidad suficiente para clonación, fue necesario probar cantidades diferentes de DNA genómico. Se probaron cantidades de DNA de 200ng para LC15 y de 400ng para LC15 2X, lográndose una buena amplificación en ambos casos, pero resultando mayor la abundancia de la banda para LC15 2X, lo que indica que para la obtención de productos que se opte clonar directamente, es mejor utilizar 400ng de templado (véase figura 13).



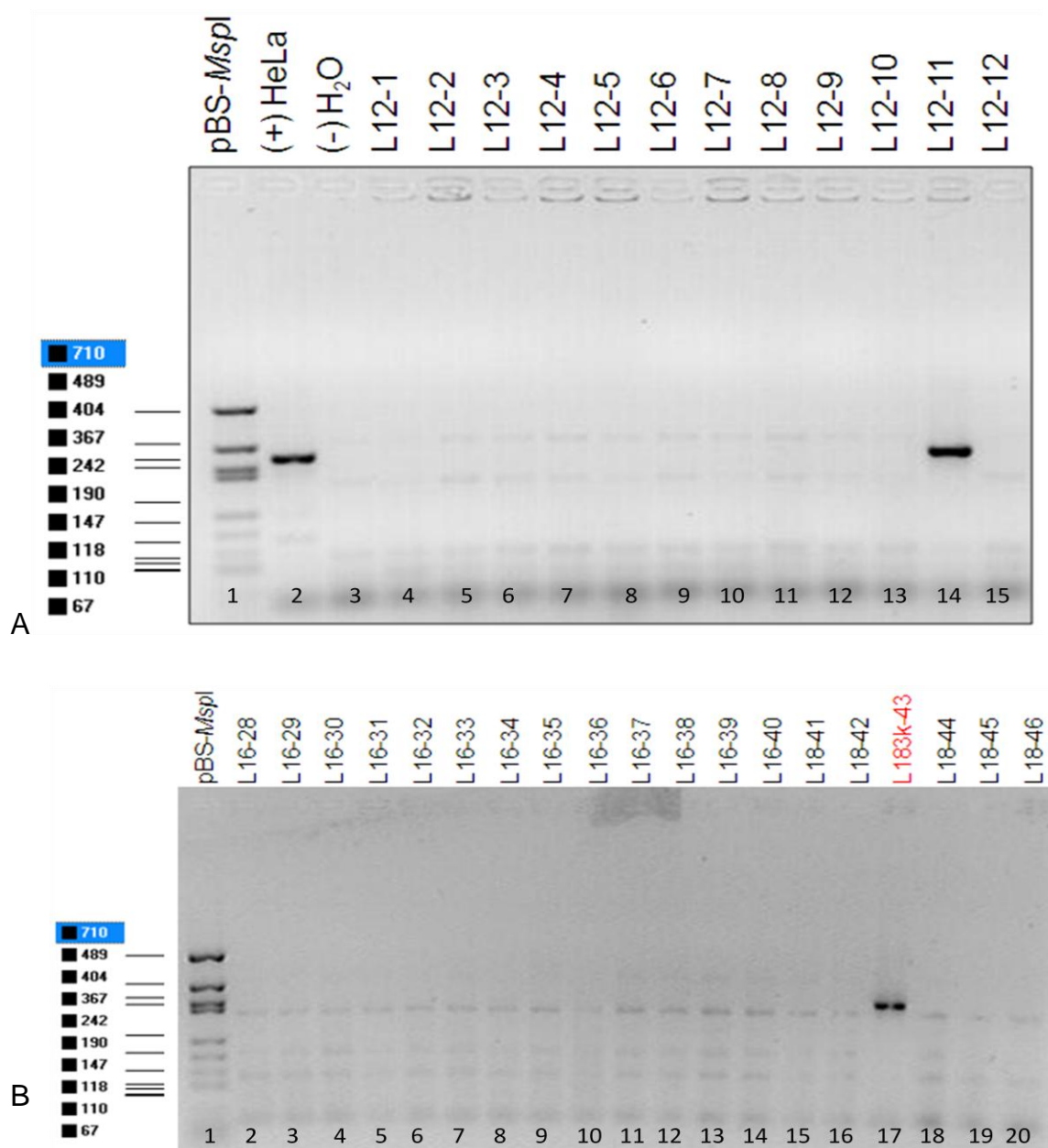
**Figura 13. Resultado de la PCR larga para el fragmento de ~3kb para LC15.** A la izquierda se muestra una representación gráfica del genoma viral, donde son señaladas las regiones a las que se unen los iniciadores utilizados para amplificar este fragmento. La flecha de mayor longitud en la parte interna del círculo, representa el amplicón de interés. A la derecha se muestra la electroforesis de los amplicones en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular ( $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Pst* I); en el segundo el control negativo de la PCR; y en los carriles indicados como LC15 y LC15 2X, 200ng y 400ng de templado de DNA proveniente de la biopsia de lesiones, respectivamente.

### **5.6 Clonación de los amplicones en el vector pCR<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> XL.**

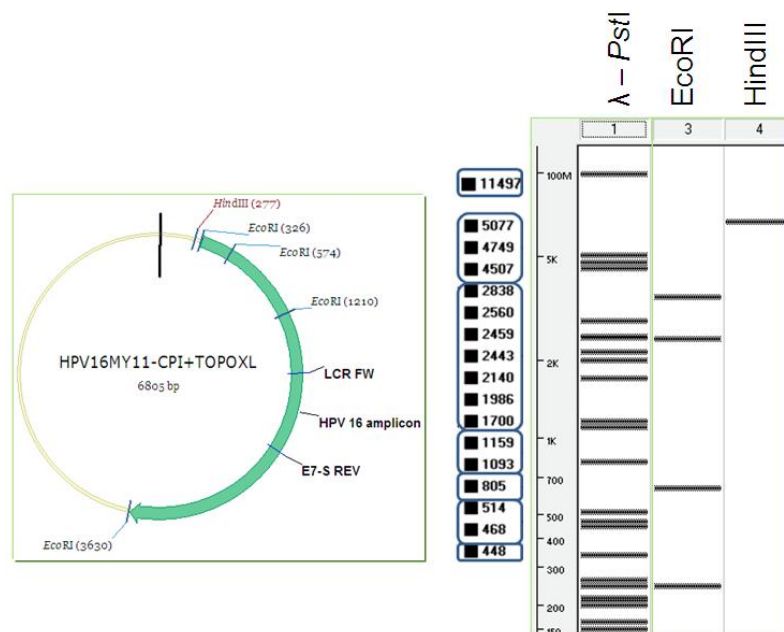
Luego de haber obtenido de las PCRs los productos de interés con abundancia y predominancia, se procedió a clonarlos. Las clonas positivas fueron rastreadas mediante PCR en colonia con los iniciadores PGMY<sup>31</sup>, anteriormente descritos como capaces de amplificar en el genoma viral una región convenientemente ubicada en el traslape de ambos fragmentos sub-genómicos de ~3 y ~5kb. Se observó una banda única de 450pb que delató a aquellas clonas que contenían vectores portando ya sea el fragmento de ~5kb o el de ~3kb (*véase figura 14*).

### **5.7 Caracterización enzimática de las clonas positivas.**

La caracterización fue realizada mediante cortes con la enzima de restricción *Eco R1*, dado que el patrón esperado para ésta sobre clonas portadoras, ya sea del fragmento sub-genómico de ~3 o del de ~5 kb, se conocía de antemano y se había establecido que sería capaz de distinguir específicamente su origen a partir de VPH 16 (*figura 15*). Adicionalmente, con la enzima *Hind III*, que al carecer de sitio de reconocimiento en el genoma viral, lineliza los plásmidos recombinantes y el tamaño revelado confirma que el plásmido, en efecto, porta el fragmento sub-genómico en cuestión (~3kb o de ~5 kb).



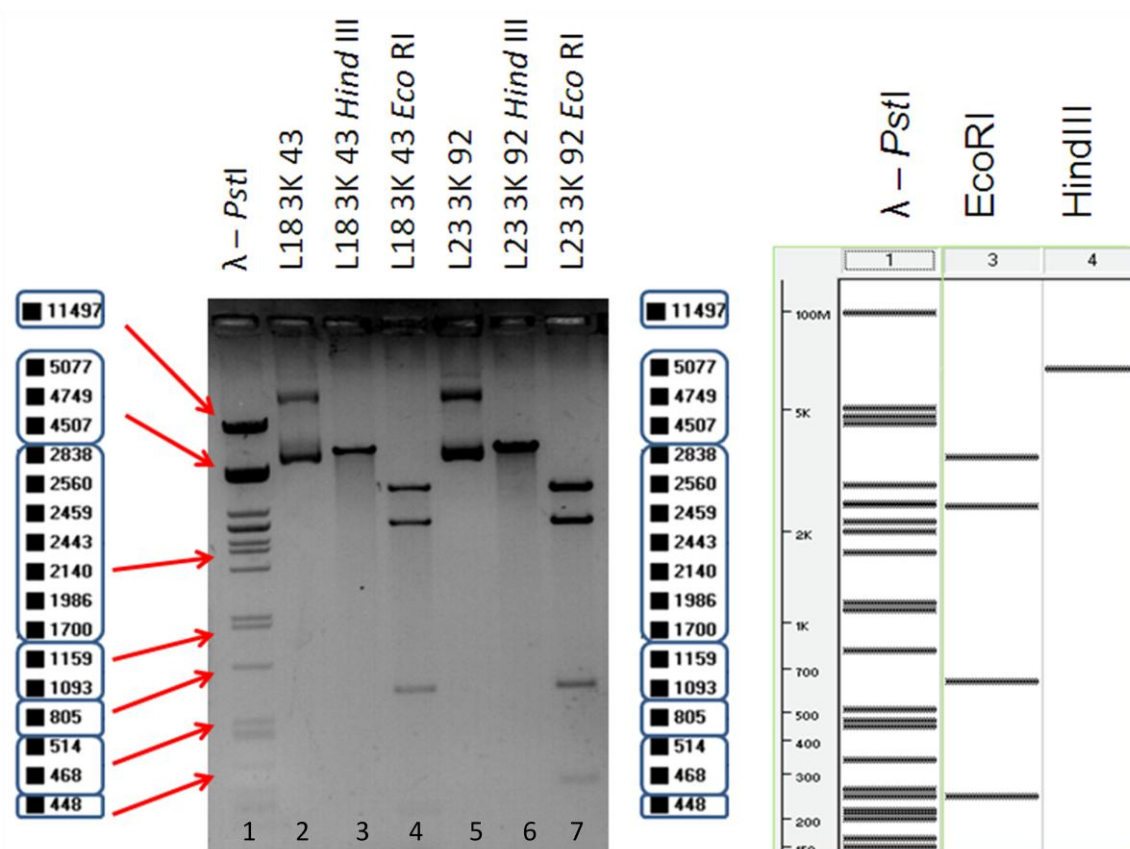
**Figura 14. Tamizaje mediante PCR en colonia de vectores recombinantes portadores del fragmento sub-genómico de interés.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%, en el cual fueron identificadas las clonas que contenían los vectores portadores de fragmentos sub-genómicos de ~3kb. A En el primer carril el marcador de peso molecular pBS digerido con la endonucleasa de restricción *Msp* I, en el segundo se aprecia el control positivo que en este caso es DNA extraído de células HeLa cuyo amplicón es de 450 pb. Nótese que la muestra positiva (L12-11) en el carril 14 presenta el mismo patrón electroforético. B Se muestra el mismo marcador de peso molecular en el primer carril y en el resto de los carriles a alícuotas de las PCRs de clonas, pudiéndose apreciar otra clona candidata detectada como positiva en el carril 17 (L18 3k 43).



**Figura 15. Caracterización enzimática *in silico*.** A la izquierda se representa gráficamente el vector pCR® TOPO® XL después de haber sido ligado con el amplicón producto del PCR largo de ~3Kb de VPH 16. Se muestran además los lugares donde cortan las enzimas usadas para caracterizar las clonas. A la derecha se incluye una imagen *in silico* de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión del vector con ambas enzimas *Eco* R1 y *Hind* III; como marcador de peso molecular se incluye a  $\lambda$ -*Pst*I.

Las clonas que resultaron positivas en este análisis (por PCR con iniciadores PGM Y y por caracterización con *Eco* R1 y *Hind* III) fueron crecidas y se les extrajo posteriormente el DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina<sup>14</sup>. Del material biológico obtenido se utilizaron 3µg en cada análisis posterior. Como se observa en la figura 15 y 16, los resultados coinciden con el patrón electroforético esperado para VPH 16. Las clonas identificadas fueron secuenciadas, para no dejar duda alguna de su identidad.





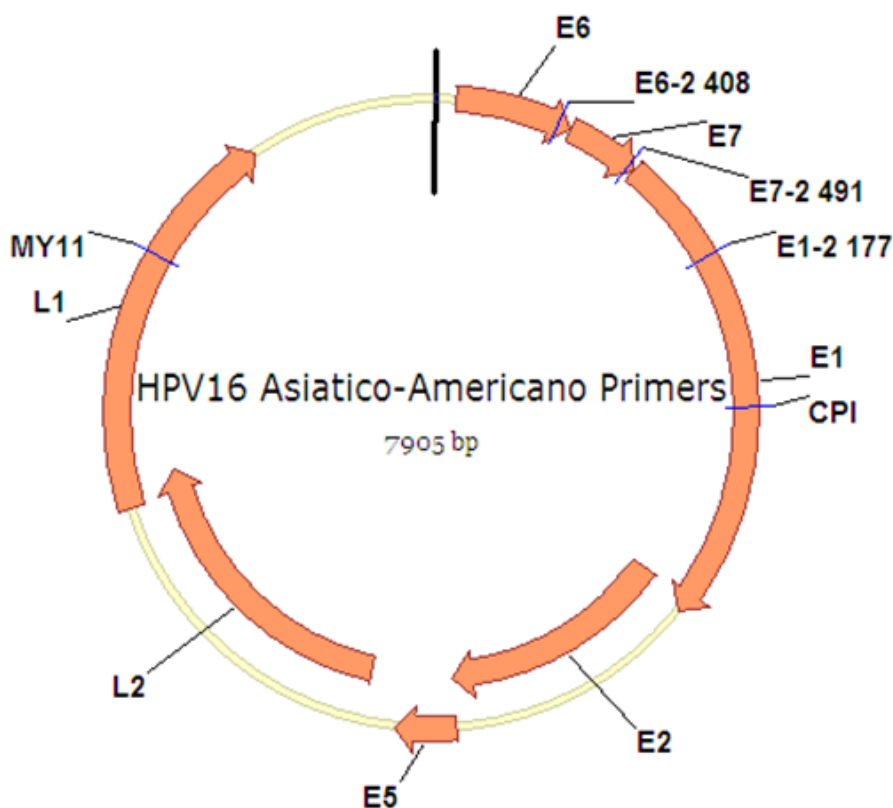
**Figura 16. Patrón electroforético de restricción con las enzimas *Eco* RI y *Hind* III.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observa el patrón esperado tanto *in silico* como en el gel. A la izquierda el gel; como marcador de peso molecular se usó  $\lambda$  PstI. En los carriles segundo y quinto se muestran los plásmidos sin digerir, los carriles 3 y 6 corresponden a la digestión con *Hind* III de cada clona, mientras que los carriles 4 y 7 son los productos de la digestión con la enzima *Eco* RI. A la derecha se muestra el mismo patrón electroforético predicho *in silico*.

### 5.8 Secuenciación de las clonas caracterizadas.

Dado que en una secuenciación nucleotídica promedio se obtienen lecturas de aproximadamente 1kb, para poder obtener la secuencia completa de los amplicones subgenómicos, se recurrió a la utilización de los otros iniciadores descritos en material y métodos. Con la ayuda de estos iniciadores fue posible obtener la casi totalidad de la secuencia de los fragmentos subgenómicos (véase figura 17), aunque para completar estas, se recurrió al



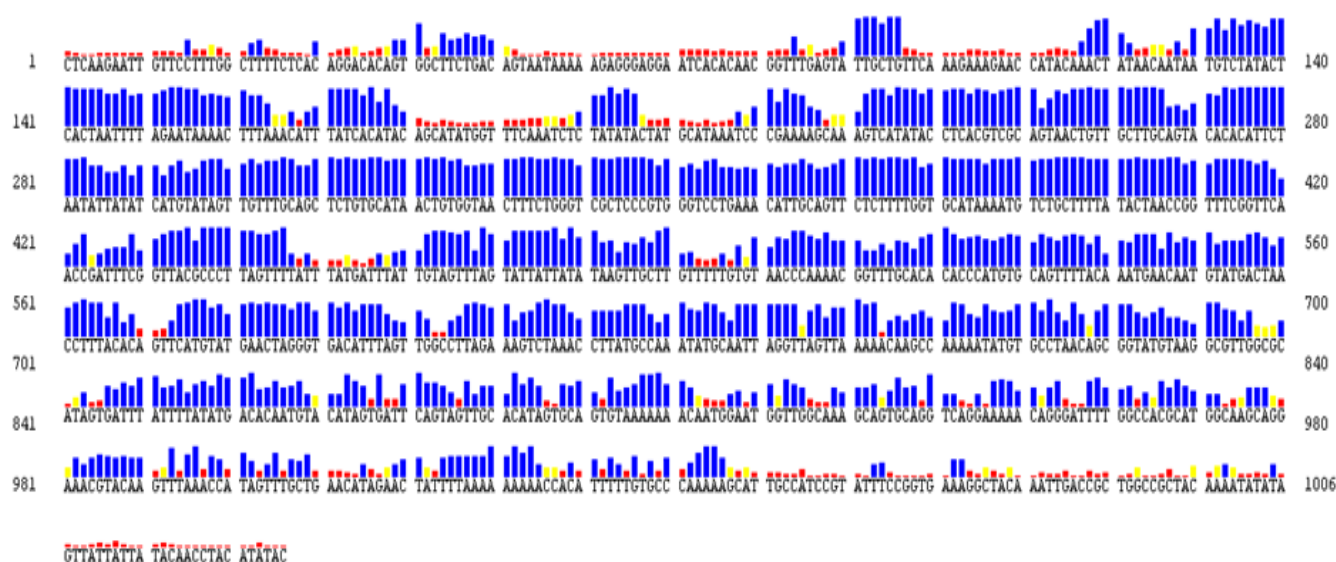
ensamblaje de las secuencias con partes del genoma de VPH 16 depositado en el Genbank.



**Figura 17. Esquema representando el genoma de VPH 16.** Las flechas representan los marcos de lectura de VPH 16, cuyos rótulos poseen una letra y un número. Los rótulos restantes representan cada uno de los sitios blanco de los iniciadores que fueron escogidos para la secuenciación.

### 5.9 Verificación de la calidad de las secuencias obtenidas.

La calidad de las secuencias es notificada por el programa que utiliza el secuenciador y lo arroja en forma de una gráfica, donde básicamente se nota a grandes rasgos la calidad en la purificación antes de la lectura de los amplicones. Vale la pena resaltar este punto, ya que, como se muestra en la figura 18, una buena purificación hace más confiables los resultados obtenidos.



**Figura 18. Gráfico que representa la secuencia de uno de los amplicones secuenciados con iniciadores internos.** L15 3k16 secuenciada con el iniciador E6-2 408, se describe con una barra la probabilidad de que cada una corresponda a la base encontrada durante la secuenciación. Las barras de menor intensidad y altura representan dye blobs (por su nomenclatura en inglés: mancha de colorante).

### 5.10 Confirmación de las secuencias virales clonadas.

Las secuencias generadas en este estudio se usaron como señuelo para rastrear en el Genbank los registros allí resguardados, con alta similitud para con dichas secuencias (véase figura 19). El resultado de este rastreo reveló que las secuencias así identificadas correspondían en efecto a VPHs 16. Se obtuvo una gran similitud de LC15 con una clona reportada anteriormente por Chen, *et al.*, en 2005<sup>32</sup>. Por otro lado, LC12 presentó una similitud cercana al 100% a la variante de VPH 16 Asiático-Americana, que es una variante que se encuentra diseminada por América Latina.

Accession	Description	Max score	Total score
<a href="#">AF534061.1</a>	Human papillomavirus type 16 East Asian type, complete genome	<a href="#">3559</a>	6003
<a href="#">FJ610150.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU5, complete genome	<a href="#">3531</a>	5970
<a href="#">AY686580.1</a>	Human papillomavirus type 16 isolate Qv16936E, complete genome	<a href="#">3515</a>	5893
<a href="#">FJ610149.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU4, complete genome	<a href="#">3509</a>	5887
<a href="#">FJ610147.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU2, complete genome	<a href="#">3509</a>	5898
<a href="#">FJ610146.1</a>	Human papillomavirus type 16 strain CU1, complete genome	<a href="#">3509</a>	5887

**Figura 19. Blastn de las secuencias obtenidas.** Se muestran las secuencias mayormente similares a las obtenidas en nuestro laboratorio. En el panel superior se incluyen los resultados para LC15 y en el inferior para LC12.

### 5.11 Alineamiento de las secuencias.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando ClustalW con el objetivo de encontrar diferencias nucleotídicas. Fue interesante encontrar diferencias en las secuencias de ambos VPHs (LC12 y LC15), tanto entre ellos como con la secuencia de referencia (*figura 20*).

CONTIG-L15-3K	CTACTTTGTTTTCTATACAT-ATAGCTTTTAACTCTAGGACTAATATTATTGTCTACACA 821
CONTIG-L12-3K	CTACTTTGTTTTCTATACAT-ATAGCTTTTAACTCTAGGACTAATATTATTGTCTACACA 800
REF3250	TTTCACTGCTTGTGTAACATTGTGTCTATGCAACATAAA--TAAACTTATTGTTTCAACA 758
	* *
CONTIG-L15-3K	AACACAACCATTCCTCCCATGAACATGCTA-AACTTTGAATGTGTAATAATAAACAATATTG 352
CONTIG-L12-3K	AACACAACCATTCCTCCCATGAACATGCTATAACTTTGAATGTGTAATAATAAACAATATTG 332
REF3250	AATTCCACTATTTTGGAGGA-----CTGGAAATTTGG-TCTACAACCTCCCCCAGGAGGC 291
	** *

Cladogram

```

graph LR
    A[CONTIG-L15-3K: 0.00730] --- B[CONTIG-L12-3K: 0.00730]
    B --- C[REF3250: 0.96561]
  
```

**Figura 20. Imagen representativa del alineamiento de las secuencias de LC15 y LC12.** Se muestran algunas diferencias en las clonas secuenciadas, tanto entre estas como con respecto a clona de referencia (REF3250; correspondiente a la variante asiático americana de VPH 16).

### 5.12 Biobanco.

Con la finalidad de explorar en el futuro posibles aplicaciones de las regiones sub-genómicas del VPH16 presentes en las infecciones de las pacientes incluidas en el estudio, las clonas bacterianas portadoras de estas, los ADNs plasmídicos y las secuencias derivadas de estos, fueron ingresadas en el Biobanco de nuestro Departamento sede del presente estudio, con lo que este trabajo contribuyó con:

**Cuadro 10. Biobanco.** Recuento del material biológico obtenido y el diagnóstico clínico de las pacientes al momento de la obtención de la muestra.

CLAVE DE PACIENTE	CLONAS DE 3KB	CLONAS DE 5KB	TIPIFICACIÓN VIRAL (VPH)	DIAGNÓSTICO CLÍNICO
LC 12	1	-	16	LIEAG (CaCU <i>in situ</i> y condiloma)
LC 15	14	11	16, 83	CaCU, cuello uterino destruido por tumoración
LC 18	1	-	16, 83	adenocarcinoma endocervical moderadamente diferenciado a invasor
LC 23	2	-	16, 52	LIEAG (displasia moderada y condiloma atípico)
LC 24	17	-	16	LIEAG (displasia moderada y condiloma)
LC 44	1	-	58	Lesiones acuminadas

## **CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN**

### **6.1 Aspectos técnicos de la metodología desarrollada.**

#### **6.1.1 Diseño de iniciadores.**

Como parte de la identificación de los genotipos de VPH se han realizado esfuerzos por clonar los genomas virales y conservarlos en un centro de referencia. Cada vez que se describe un nuevo tipo viral, el protocolo a seguir es clonar y secuenciar su genoma completo. El sistematizar la clonación de los genomas virales sería un recurso inagotable para investigación, ya que al agotarse la muestra original, bastaría volver a transformar bacterias y éstas lo amplificarían y harían disponible nuevamente.

El alineamiento de las cuatro especies de VPHs seleccionadas, nos permitió diseñar de un par de iniciadores que resultaron muy útiles para la amplificación de casi cualquier especie de VPH; especialmente de aquellas oncogénicas y de interés epidemiológico. La versatilidad de este método de obtención de fragmentos sub-genómicos está dada por la utilización de iniciadores consenso que ofrecen la ventaja de amplificar más tipos virales con la misma reacción de amplificación (PCR), a diferencia de los iniciadores diseñados por Menzo y colaboradores en el 2001, que sólo amplificaban el tipo viral para el que fueron diseñados. Por otra parte, Chow y Leong en 1999, refieren la amplificación de varios genotipos de VPHs simultáneamente como una desventaja, ya que el objetivo de su estudio fue determinar la secuencia de un virus novel, por lo que recurrieron a secuencias específicas en el diseño de

sus iniciadores, amplificando un solo tipo viral y descartando la necesidad de estudiar biológicamente los genes virales por separado.

### **6.1.2 Estandarización de la PCR.**

Durante el proceso de obtención del fragmento de ~5Kb se logró obtener una banda prominente con el tamaño del amplicón sub-genómico esperado. Sin embargo, se notó una gran cantidad de bandas inespecíficas. Existen varias explicaciones para este fenómeno, encontrándose entre las más importantes un posible exceso de iniciadores, especialmente en el caso de nuestra investigación, ya que su optimización se pasó un tanto por alto al optar por usar la concentración teóricamente ideal, más no prácticamente demostrada como la óptima para cada caso. Según Lebedev, *et al.*, una ejecución robusta de la PCR es de suma importancia para los métodos analíticos, especialmente en la detección de moléculas de DNA de copia sencilla, agentes infecciosos portados en sangre, microbios de alto riesgo biológico, genes defectuosos o protooncogenes, SNPs y muestras forenses<sup>33</sup>.

Una estrategia para mejorar la especificidad de la PCR es emplear la técnica llamada “Hot Start” (por su nomenclatura en inglés: inicio en caliente), que busca prevenir la extensión prematura de complejos inespecíficos iniciador-templado en las condiciones de baja astringencia durante los momentos de la preparación de la mezcla de reacción y antes de alcanzar las altas temperaturas típicas de una PCR. En esta variante de la PCR, la extensión de los iniciadores es bloqueada hasta que la mezcla de reacción alcance una elevada temperatura, donde la astringencia de la hibridación iniciador/diana es

óptima y los posibles apareamientos entre los propios “primer dimers” (dímeros de iniciadores) son minimizados. Esta estrategia fue utilizada para estandarizar la PCR larga empleada en el presente trabajo, siendo los resultados de esta aplicación consistentes con la eliminación de los productos inespecíficos encontrados inicialmente, tanto para los amplicones de ~5kb como para los de ~3kb.

Una vez estandarizada, dicha mejora se introdujo al protocolo, permitiendo la amplificación preferencial de los fragmentos sub-genómicos anhelados (de ~3kb y de ~5kb), incrementando su especificidad y rendimiento por la combinación de temperaturas restrictivas y permisivas de amplificación, tal como lo han referenciado Huang, & Cloutier en 2007 y Levano-Garcia, *et-al.*, en 2005.

### **6.1.3 Clonación y selección de clonas.**

La ligación se realizó siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante, sin embargo, se utilizó un protocolo de selección, para minimizar la obtención de plásmidos vacíos o con amplicones más pequeños de lo esperado. En el método convencional, referenciado por Lu en el 2003, para seleccionar los plásmidos recombinantes deseados, se basa en escoger las colonias transformantes de manera aleatoria, preparar el DNA plasmídico, y caracterizar los plásmidos recombinantes con una digestión enzimática, puede llegar a ser muy tedioso e intenso, sobre todo cuando se tienen que examinar grandes cantidades de colonias. Además, es necesario crecer las clonas recombinantes por unas 12 horas o más, para poder obtener suficiente DNA

plasmídico para la digestión enzimática y la secuenciación. Otra opción es realizar una hibridación del tipo Southern blot para detectar el inserto de interés, pero este método representa una gran inversión en tiempo y materiales. Por lo tanto, lo deseable es tener un método para examinar los plásmidos candidatos y subsecuentemente confirmar la identificación por digestión o secuenciación del DNA plasmídico purificado; con el mismo se pueden llegar a conseguir varias metas: en primer término la más obvia es determinar si alguna colonia porta el plásmido con el inserto de interés; en segundo lugar, con los iniciadores apropiados, determinar la orientación del inserto y como última meta los amplicones se pueden digerir o secuenciar para caracterizar el producto<sup>34</sup>. La selección de los iniciadores para la PCR es dictada por el objetivo de la detección: si se requiere únicamente detectar la presencia del inserto, entonces se puede recurrir a iniciadores cuyo blanco se encuentre en la secuencia del vector, flanqueando el sitio de clonación, como es el caso de los M13 utilizados en este estudio.

Dados los argumentos arriba mencionados, se optó por utilizar la PCR directa de colonia como un método para seleccionar las clonas portadoras de los plásmidos, cuyo fragmento insertado fuera el sub-genómico de interés. En el caso de Cao, M., *et al.*, 2009, se evaluó esta técnica para amplificar, tanto secuencias provenientes de plásmidos, como del DNA genómico de una especie de alga. Este método hace posible una simple y rápida detección de grandes cantidades de células transformadas, así como la rápida amplificación de fragmentos específicos provenientes del DNA genómico, útiles para su posterior clonación. Este método marcó la pauta para la obtención de los



fragmentos sub-genómicos, porque permitió identificar con certeza los plásmidos portadores de dichos insertos. Inicialmente el protocolo se estandarizó para un volumen de 30µL, sin embargo la ajustada fue optimada a 15µL, para optimizar al máximo los reactivos utilizados.

#### **6.1.4 Secuenciación.**

Para la secuenciación se seleccionaron iniciadores previamente publicados<sup>31</sup>. El criterio de selección de los iniciadores fue que al obtener la secuencia de los amplicones, estas estuvieran sobrelapadas, lo que provee una mayor certeza de la secuencia obtenida. De las clonas obtenidas, la mayoría fueron resguardadas y dos de estas fueron escogidas para la secuenciación de sus genomas virales.

#### **6.2 Aspectos científicos de la metodología desarrollada.**

Las ventajas que presenta la metodología expuesta en este trabajo sobre las estrategias presentadas con anterioridad por grupos como el de Menzo, Chow & Leong y Forslund & Hansson, residen principalmente en la capacidad para obtener el genoma completo del VPH, en una cantidad mínima de fragmentos. En nuestro caso fue de solamente dos; a diferencia de los estudios anteriores, en donde fue incluso necesario diseñar iniciadores específicos para re-amplificar los amplicones obtenidos. Otro problema común en la amplificación de genomas completos fue la obtención de amplicones con mutaciones y deleciones aleatorias inclusive de hasta 1kb, problema con el que no nos topamos en ninguna ocasión, ya que desde la caracterización con

endonucleasas de restricción siempre logramos obtener los mismos patrones que ya habían sido predichos *in silico*. Lo anterior demuestra un gran avance en cuanto a la obtención y almacenaje del material genético, descartando la necesidad de amplificar los ocho genes del VPH por separado, disminuyendo grandemente el espacio utilizado para su resguardo y teniendo en cuenta que no se perderían promotores y otras secuencias asociadas a los genes ya que se obtienen fragmentos sub-genómicos. Finalmente estos amplicones obtenidos servirán para futuras investigaciones sobre todo para relacionar la secuencia del VPH infectante con el diagnóstico clínico de cada paciente.

## **PERSPECTIVAS**

La estrategia desarrollada ha sido adoptada por el laboratorio sede del presente trabajo, para clonar y caracterizar todos los genomas de los virus infectantes de las voluntarias y pacientes reclutadas en los proyectos de la línea de investigación sobre CaCU del laboratorio, como un esfuerzo para preservar dichos genomas y llegar a aprovecharles en investigaciones sucesivas.

## **CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES**

### **7.1 Diseño de iniciadores.**

Con el alineamiento de los genomas completos de las cuatro especies de papilomavirus distantes entre sí, se logró un diseño de iniciadores consenso, ideales para la amplificación de la mayoría de los papilomavirus humanos de interés, especialmente los que se clasifican como de alto riesgo oncogénico.

### **7.2 Estandarización de la PCR y clonación.**

Después de algunos eventos de estandarización se logró un diseño robusto de una estrategia para la amplificación y clonación de fragmentos sub-genómicos de VPHs presentes en los bioespecímenes, tanto para aquellos de ~3kb como para los de ~5kb.

### **7.3 Secuenciación.**

Se lograron detectar abundantes clonas pertenecientes a cada uno de los bioespecímenes infectados con VPH 16 del proyecto de “Lesiones”, caracterizándolas posteriormente por sus patrones de restricción. Para dos de los bioespecímenes marcados con los códigos LC15 y LC12, en los que se centró el esfuerzo de la presente tesis, la obtención de sus secuencias nucleotídicas fue casi por completo.

Las dos secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en Genbank para realizar análisis filogenéticos.

#### **7.4 Biobanco.**

Las clonas obtenidas fueron resguardadas y los datos relevantes se asociaron a las mismas en el biobanco de la Unidad de Biotecnología Médica (UBM), para su futuro aprovechamiento biomédico y biotecnológico.

## LITERATURA CITADA

1. WHO, National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. – 2nd ed. ISBN (92-4-154557-7). World Health Organization 2002.
2. WHO, Cervical cancer screening in developing countries: report of a WHO consultation. ISBN (92-4-154572-0). World Health Organization 2002.
3. INEGI. Estadísticas Vitales. Base de datos 2004.
4. Tirado-Gómez, L.L., *et al.*, Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor. Salud Pública de México / vol.47, no.5, septiembre-octubre de 2005.
5. Doorbar, J., Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clinical Science (2006) 110, 525–541.
6. de Villiers, E.M., *et al.*, Classification of papillomaviruses. Virology 324 (2004) 17– 27.
7. Calleja-Macias, I.E., *et al.*, Papillomavirus Subtypes Are Natural and Old Taxa: Phylogeny of Human Papillomavirus Types 44 and 55 and 68a and –b. Journal of Virology, Vol. 79 No. 10 (2005) 6565–6569.
8. Calleja-Macias, I.E., *et al.*, Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African and Native American variants. Virology 319 (2004) 319–323.
9. Bosch X., *et al.*, The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol (2002) 55:244–265.
10. Menzo S., *et al.*, Identification of Six Putative Novel Human Papillomaviruses (HPV) and Characterization of Candidate HPV Type 87. Journal of Virology. Vol. 75, No. 23 (2001) 11913–11919.
11. Coutlée F., *et al.*, The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. Can J Infect Dis Med Microbiol (2005);16(2):83-91.
12. Berumen J., *et al.*, Asian-American Variants of HPV16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. Journal of the National Cancer Institute. Vol. 93, No. 17, September 5, 2001.
13. Rabelo-Santos, S.H., *et al.*, Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18: Histological Findings in Women Referred for Atypical Glandular Cells or Adenocarcinoma In Situ in Cervical Smear. International Journal of Gynecological Pathology, (2006) 25:393-397.

14. Sambrook, J. & Russell, D.W., Molecular Cloning: a laboratory manual 3<sup>rd</sup> Ed. ISBN (0-87969-576-5) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
15. Altschul, S. F., *et al.*, Basic local alignment search tool, J Mol Biol (1990) 215(3): 403-10.
16. Huang, X. & Madan, A., CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. (1999), 9, 868-877.
17. Thompson, J.D., *et al.*, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994, Vol. 22, No. 22 4673-4680.
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>
19. Ho, L., *et al.*, The Genetic Drift of Human Papillomavirus Type 16 Is a Means of Reconstructing Prehistoric Viral Spread and the Movement of Ancient Human Populations. Journal of Virology. Vol. 67, No. 11, Nov. 1993, p. 6413-6423.
20. Parkin, M., *et al.*, Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74–108.
21. INEGI, Mujeres y Hombres en México 2009. ISBN (978-970-13-5169-7). Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2009.
22. Garcia, M., *et al.*, Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.
23. Runowicz, C., *et al.*, Molecular Screening for Cervical Cancer—Time to Give up Pap Tests? N Engl J Med 2007;357;16
24. Reina, J. C., *et al.*, El estado del arte en las infecciones producidas por el virus del papiloma humano. Colombia Médica Vol. 39 N° 2, 2008
25. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino.
26. Lizano, M., *et al.*, Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. Gynecologic Oncology 102 (2006) 230 – 235
27. Berumen, J., *et al.*, Vacunas preventivas y terapéuticas contra el cáncer del cuello uterino. Gamo 2006; Vol. 5 Núm. 4

28. Ghim, S., *et al.*, Cervical Cancer: Etiology, Pathogenesis, Treatment, and Future Vaccines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2002, Vol 3
29. Chow, V.T.K. & Leong, P.W.F., Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of a novel genital human papillomavirus type, HLT7474-S. Journal of General Virology (1999), 80, 2923–2929
30. Forslund, O. & Hansson B.G., Human Papillomavirus Type 70 Genome Cloned from Overlapping PCR Products: Complete Nucleotide Sequence and Genomic Organization. Journal of Clinical Microbiology 1996, Vol. 34, No. 4, p. 802–809
31. Gravitt, P.E., *et al.*, Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. Journal of Clinical Microbiology 2000, Vol. 38, No. 1, P. 357–361
32. Chen, Z., *et al.*, Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. Journal of Virology 2005, Vol. 79, No. 11, p. 7014–7023
33. Lebedev, A.V., *et al.*, Hot Start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance. Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 20 e131
34. Lu, S., *E. coli* Plasmid Vectors, Humana Press, Volumen 235, 2003 ISBN 978-1-59259-409-2
35. Cao, M., *et al.*, Chlamydomonas (Chlorophyceae) colony PCR, Protoplasma (2009) 235:107–110
36. Huang, X.Q., & Cloutier, S., Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library *BMC Genetics* 2007, **8**:18
37. Levano-Garcia, J., *et-al.*, Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers, BioTechniques (2005) 38:225–229
38. Fajardo-Ramírez, O.R., Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Marzo, 2006
39. Bernal-Silva, S., Estudio de la susceptibilidad al desarrollo de lesiones premalignas y cancerosas de cérvix en mujeres infectadas con el virus del papiloma humano. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Julio, 2007



40. Luévano-Salinas, M.E., Determinación de anticuerpos anti-VPH y su asociación con el pronóstico de la infección viral. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Octubre, 2008
41. Canedo, L. E., *et-al.*, Cell Function and Disease, Basic Books, Junio 1989, ISBN:0306432013